

REKOMBINANTEN ZWISCHEN
VERSCHIEDENEN STÄMMEN
ONKOGENER PRIMATEN-HERPESVIREN

von
Günther Keil
aus Großenhain

1981 № 307

REKOMBINANTEN ZWISCHEN VERSCHIEDENEN STÄMMEN ONKOGENER PRIMATEN-HERPESVIREN

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Günther Keil
aus Großenhain

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaftlichen
Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 4.Juli 1981

Vorsitzender der

Promotionskommission: Professor Dr.H.Wegener

Erstberichterstatter: Professor Dr.A.Pühler

Zweitberichterstatter: Professor Dr.B.Fleckenstein

Dritter Berichterstatter: Professor Dr.W.Heumann



Herrn Prof. A. Pühler und Herrn Prof. B. Fleckenstein danke ich für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung während der Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für klinische Virologie für deren freundschaftliche Unterstützung und stets gewährte Hilfe bedanken.

Diese Arbeit wurde durch eine Forschungsförderung der Wilhelm Sander-Stiftung ermöglicht.

A.	<u>Einleitung</u>	1
B.	<u>Materialien</u>	12
1.	Zelllinien und Virusstämme	12
2.	Reagenzien	12
3.	Lösungen und Puffer	14
4.	Enzyme, Nucleinsäuren, Proteine	16
5.	Geräte, Laborhilfsmittel	17
C.	<u>Methoden</u>	20
1.	Zellkultur	20
2.	Test auf Mycoplasmen	20
3.	Virusvermehrung	21
4.	Radioaktive Markierung viraler Proteine	21
a.	^{35}S -Methionin-Markierung	21
b.	Markierung mit ^{32}P -Orthophosphat	21
c.	Markierung mit ^3H - und ^{14}C -Glucosamin	22
5.	Plaque-Reinigung viraler Partikel	22
6.	Virusreinigung	22
7.	Präparation von Virus-Nucleocapsiden	23
8.	Elektronenmikroskopische Darstellung von Virus- partikeln und Nucleocapsiden	23
9.	Reinigung viraler DNA	23
10.	Reinigung bakterieller Restriktionsendonucleasen	24
a.	BamHI aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	24
b.	EcaI aus <i>Enterobacter cloacae</i>	25
c.	SmaI aus <i>Serratia marcescens</i>	25
d.	XmaI aus <i>Xanthomonas malvacearum</i>	26

11. Präparation von T ₇ -Bakteriophagen für Markerproteine	27
12. Präparation von DNA aus Lambda-Bakteriophagen	27
13. Spaltung viraler DNA mit bakteriellen Restriktions- endonucleasen	28
14. Transfektion mit viraler DNA	28
15. Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	29
a. Agarose-Gelelektrophorese	29
b. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in Tris-Borat	29
c. SDS-PAGE für DNA-Fragmente	30
16. Densitometrische Auswertung von Polaroid Typ 665-Negativen	30
17. SDS-PAGE viraler Proteine	31
18. Indirekter Nachweis von viralen Glycoproteinen nach Markierung mit ¹²⁵ J-Con A	32
a. Jodierung von Concanavalin A mit Na ¹²⁵ J	32
b. Imprägnieren des Gels	32
19. Proteolytischer Verdau viraler Proteine	33
20. Fixieren, Färben und Entfärben von SDS-Polyacryamid- gelen	33
21. Vorbereitung von Protein-Gelen für die Fluorographie	33
22. Autoradiographie und Fluorographie	34
23. Zählung radioaktiver Proben	34
24. Proteinbestimmungen	34
25. Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen	34

D.	<u>Ergebnisse</u>	
I.	<u>Strukturuntersuchungen an Wildtyp-Stämmen von H. saimiri</u>	36
1.	Untersuchungen der DNA mit Hilfe von Restriktions- endonucleasen	36
2.	Analyse der Strukturproteine von Wildtyp-Stämmen von H. saimiri	39
a.	Übersicht über die Strukturproteine	39
b.	Darstellung von Phosphoproteinen	45
c.	Identifikation der Glycoproteine von H. saimiri	45
d.	Bestimmung der Hüllproteine	49
II.	<u>Strukturanalyse der DNA von H. saimiri-Rekombinanten</u>	50
1.	Rekombinanten aus intakter L-DNA mit einheitlichen H-DNA-Sequenzen aus Wildtyp-Virus	50
2.	Rekombinanten aus Restriktionsfragmenten von L-DNA und einheitlicher H-DNA	58
3.	Rekombinanten zwischen attenuiertem und Wildtyp-Virus	67
4.	Rekombinanten mit verschiedenen H-DNA-Regionen	73
5.	Rekombinanten zwischen H. saimiri, H. ateles und H. aotus Typ II	80
III.	<u>Vergleich der Strukturproteine der Rekombinanten mit den Wildtyp-Stämmen</u>	82
E.	<u>Diskussion</u>	91
F.	<u>Zusammenfassung</u>	98
G.	<u>Literaturverzeichnis</u>	100
H.	<u>Lebenslauf</u>	109



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546222_0031

A. Einleitung

Herpesviren sind große, eingehüllte Viren, deren Genome aus linearer, doppelsträngiger DNA bestehen. Sie besitzen ein ikosaedrisches Capsid, welches aus 162 Capsomeren aufgebaut ist. Im Laufe der Virusreplikation werden die Nucleocapside zunächst im Zellkern zusammengesetzt. Durch Ausknospen der Nucleocapside durch die innere Kernmembran in den perinukleären Raum entstehen die kompletten Viruspartikel. Somit ist die Hülle der Herpesviren aus der Substanz der inneren Kernmembran abgeleitet (Tooze, 1973). Herpesviren sind in der Natur sehr weit verbreitet. Sie konnten von Vertretern aller Wirbeltierklassen, darunter zahlreichen Säugetierarten, isoliert werden. Die Genomstruktur der einzelnen Herpesviren zeigt große Unterschiede; entsprechend sind die Herpesviren auch in den antigenen Eigenschaften ihrer Strukturproteine verschieden. Die Variabilität der DNA äußert sich beispielsweise in extremen Unterschieden des Basengehaltes der verschiedenen Genome; die DNA des Hunde-Herpesvirus besitzt 33% Guanin + Cytosin (G+C), das Pseudorabiesvirus der Schweine etwa 72% G+C. Das Molekulargewicht (MW) der DNA reicht von 84 Megadalton (md) beim Herpesvirus der Kanalkatzenfische bis zu etwa 152 md beim menschlichen Cytomegalovirus (Geelen et al., 1978; de Marchi et al., 1978). Ferner zeigen sich in der Anordnung kodierender bzw. repetitiver DNA-Segmente erhebliche Unterschiede zwischen verschiedenen Herpesviren. Einzelne besitzen repetitive Sequenzen in Tandem-Orientierung, beispielsweise das Herpesvirus der Kanalkatzenfische und das Epstein-Barr(EB)-Virus des Menschen. Bei anderen Herpesviren, z.B. dem Pseudorabiesvirus, findet sich ein

Paar langer, inverser Repetitionen. Weitere Herpesviren enthalten zwei Paare inverser Repetitionen, welche jeweils einen kurzen und einen langen Strang nicht repetitiver DNA einrahmen. Beispiele hierfür sind das menschliche Herpes-simplex-Virus, das menschliche Cytomegalovirus und das Virus der Marek'schen Lymphomatose der Hühner (Sheldrick et al., 1974).

Herpesviren beanspruchen besonderes Interesse, da zahlreiche ihrer Vertreter bei der Entstehung bösartiger Tumoren mitwirken oder sogar in hohem Maße onkogen sind (Fleckenstein, 1979; zur Hausen, 1980). Seit langem ist bekannt, daß das Lucké-Herpesvirus bei Leopardenfroschen (*Rana pipiens*) an der Entstehung von Nierentumoren beteiligt ist (Fawcett, 1956). Dieses Tumorstoff-System wurde in seinen biologischen Eigenschaften intensiv studiert. In den Tumoren kann im Winter Virus nachgewiesen werden, im Sommer aber nur noch virale RNA. Wird im Sommer Tumorgewebe bei +8°C in Kultur genommen, so finden sich nach kurzer Zeit Herpesviren in den Zellen (Rafferty, 1964; Mizell et al., 1968). Als Erklärung für dieses Phänomen wird angenommen, daß das Virus von einer temperatur-sensitiven (ts) DNA-Polymerase repliziert wird, die nur bei niedrigen Temperaturen aktiv ist.

Ein weiteres Beispiel onkogener Herpesviren ist das Virus der Marek'schen Erkrankung der Hühner, das in den Tieren schnell wachsende Tumoren des lymphatischen Systems hervorruft (Epstein et al., 1968; Nazerian et al., 1968). Diese Tumorerkrankung besitzt erhebliche wirtschaftliche Bedeutung in der Geflügelzucht. In den vergangenen Jahren war es möglich, dieses Virus zu einem Impfstoff zu attenuieren. Mit Hilfe dieser Vakzine war es erstmals möglich, gegen eine natürlich vorkommende maligne Erkrankung Immunprophylaxe

auf breiter Basis zu schaffen.

Von besonderer klinischer Bedeutung für den Menschen ist das EB-Virus. Es gibt zahlreiche Argumente dafür, daß das EB-Virus bei der Entstehung von zwei menschlichen Tumorformen kausale Bedeutung besitzt. Sowohl beim Burkitt-Lymphom, dem bedeutendsten Malignom des Kindesalters in bestimmten Gegenden Zentralafrikas und Neuguineas, als auch beim weltweit verbreiteten Karzinom des Nasopharynx (Schmincke-Tumor) spielt das EB-Virus eine entscheidende Rolle bei der Tumorentstehung. Tumorzellen enthalten regelmäßig virale Nukleinsäure und ein nukleäres, virales Antigen; außerdem sind bei Patienten hohe Antikörper-Titer gegen frühe Antigene und Strukturproteine des EB-Virus nachweisbar (Epstein et al., 1964; Henle and Henle, 1966; zur Hausen et al., 1970; zur Hausen und Schulte-Holthausen, 1972; Wolf et al., 1973). Die onkogene Potenz des EB-Virus zeigt sich besonders deutlich darin, daß südamerikanische Krallenaffen der Gattung Saguinus (Shope et al., 1973; Wolf et al., 1975; Sundar et al., 1981) und Eulenaffen der Gattung Aotus (Epstein et al., 1973) nach Infektion mit EB-Virus Tumoren des lymphatischen Systems entwickeln können.

Die besondere Problematik in der biochemischen Charakterisierung von EB-Virus und virustransformierten Zellen liegt darin, daß das Virus nicht in permissiven Zellkulturen produktiv repliziert werden kann und somit virale Strukturkomponenten nur in unbefriedigender Weise für eine biochemische Analyse zugänglich sind. Daher galt es als wesentlicher Fortschritt der Herpesvirus-Onkologie, daß weitere Herpesviren entdeckt wurden, welche im lytischen Zyklus in Zellkulturen wachsen und bei Neuweltprimaten in hohem Maße onkogen sind. Herpesvirus saimiri (H. saimiri), erstmals von Melendez et

al., (1968) isoliert, induziert bei Krallenaaffen, Eulenaaffen und zahlreichen anderen Neuweltaffen-Spezies sowie bei Kaninchen innerhalb weniger Wochen ein rasch wachsendes malignes Lymphom oder eine akute lymphatische Leukämie (Abb. 1). Ähnliche maligne Tumoren werden in hoher Frequenz bei Marmosets und anderen Neuweltprimaten induziert (Melendez et al., 1969; Wolfe et al., 1971; Fleckenstein, 1979). Die Biologie dieser Viren sowie Pathologie, Patho-Histologie und die immunologischen Aspekte dieser Tumorerkrankungen wurden



Abb. 1: Situs eines Krallenaaffen (*Saguinus oedipus*), der vier Wochen nach Infektion mit *H. saimiri* an einem malignen Lymphom einging. Auffallend sind die deutlich vergrößerten Mesenteriallymphknoten, Splenomegalie und eine auf das Vielfache der Norm angeschwollene blasse Leber.

ausführlich in den zusammenfassenden Arbeiten von Deinhardt et al., (1973); Fleckenstein and Desrosiers (1981); Fleckenstein (1979) und Falk (1980) beschrieben.

Die DNA-Moleküle von *H. saimiri* sind lineare Doppelstränge von etwa 100 md. Sind leicht variabel in der Länge, wobei die meisten Moleküle zwischen 96 und 110 md liegen. Dies entspricht 146-166 Kilo-Basenpaaren (kbp) (Fleckenstein and Wolf, 1974). Nicht fragmentierte DNA aus gereinigten Viruspartikeln bandet im CsCl-Gradienten in zwei Dichten. Zehn Prozent der DNA-Sequenzen finden sich bei 1,729 g/ml (H-DNA) und 90% bei 1,705 g/ml (M-DNA). Dies entspricht 70,6 bzw. 45,4% G+C-Gehalt. Wird die M-DNA durch Scheren fragmentiert, ergeben sich ebenfalls zwei Dichteklassen. Die schwere DNA (H-DNA) bandet entsprechend 70,6% G+C, die leichte (L-DNA) entsprechend 35,8% G+C. In solchen Gradienten repräsentiert die L-DNA etwa 70% und die H-DNA etwa 30% der gesamten DNA-Sequenzen. Aus diesen Befunden folgte, daß *H. saimiri* Viruspartikel zwei Typen viraler Genome enthalten, (1) M-Genome, die zu 70% aus L-DNA und zu 30% aus H-DNA in kovalenter Bindung bestehen und (2) H-Genome, welche ausschließlich aus H-DNA-Sequenzen bestehen (Fleckenstein and Wolf, 1974; Fleckenstein and Bornkamm, 1975). Reassoziationskinetiken und Restriktionsenzym-Analysen ergaben, daß die H-Sequenzen in H-Genomen und M-Genomen offenbar identische Basensequenzen darstellen. Weiterhin ergab sich, daß die H-Genome aus repetitiven Einheiten von 830 Kilo-Dalton (kd) bestehen, die in Tandem angeordnet sind (insgesamt ca. 120 Einheiten/Genom) (Bornkamm et al., 1976). H-Genome sind auf Grund ihrer geringen genetischen Komplexität eine Form von defekten Genomen. Die Verteilung von H-DNA und L-DNA innerhalb des M-Genoms wurde mit Hilfe partieller Denatu-

rierung im Elektronenmikroskop analysiert. Durch Zuordnung von Denaturisierungskarten mit Hilfe eines Computerprogramms ergab sich, daß die L-DNA als ein Segment mit einer Größe von 71,6 md vorliegt und an beiden Enden von H-DNA-Strängen flankiert wird. Die Längen dieser Enden sind variabel, im allgemeinen gilt, daß Moleküle mit einem langen H-DNA-Segment an einem Ende am jeweils anderen Ende ein kurzes H-DNA-Segment besitzen. Dies führt zu einer begrenzten Größenheterogenität (Bornkamm et al., 1976). Komplette M-Genome sind infektiös in Zellkultur (Fleckenstein and Bornkamm, 1975). Weder isolierte L-DNA noch isolierte H-DNA ergibt nach Transfektion infektiöses Virus. Das durch M-DNA aus Transfektion erhaltene Virus ist nicht von dem ursprünglichen Stockvirus unterscheidbar, aus dem die virale DNA präpariert wurde. Solche aus Transfektionen erhaltenen Virusstocks enthalten die gleichen relativen Mengen an M- und H-Genomen. Die H-Genome werden demnach während der Replikation der M-Genome gebildet (Fleckenstein et al., 1975; Fleckenstein and Bornkamm, 1975).

Das lichtmikroskopische Bild der cytopathogenen Veränderungen infizierter Zellkulturen läßt keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Virusstämmen erkennen (Abb. 2).

Die ersten Untersuchungen zur Strukturanalyse der H. saimiri-DNA wurden mit dem H. saimiri Stamm No.11 durchgeführt (Falk et al., 1972). Weitere Untersuchungen mit anderen Wildtyp-(wt) Stämmen zeigten im wesentlichen eine identische Grundstruktur der viralen Genome. Beispielsweise fanden sich zwischen Stamm No.11 und Stamm OMI (Hunt et al., 1973) weitgehende Homologie in Kreuzhybridisierungsversuchen. Der Vergleich der Temperaturstabilität von Homo- und Heteroduplices ergab weniger als 2% Basendivergenz (Keil et al.,

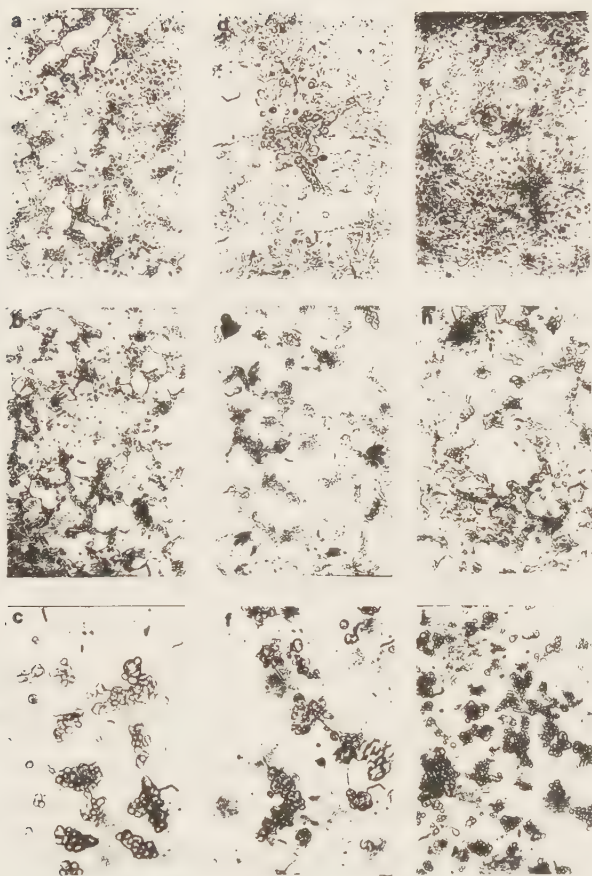


Abb. 2: Durch verschiedene *H. saimiri* Stämme in OMK-Zellkultur induzierte cytopathogene Effekte. (a-c) OMK-Zellen infiziert mit Stamm No.11 zu frühem, mittlerem und spätem Zeitpunkt. (d-f) wie (a-c) nur mit Stamm OMI infiziert, (g-i) wie (a-c), nur mit Stamm S 295 C infiziert.

1980). Dies stimmt überein mit vergleichenden Restriktionsanalysen, die bei allen Virusstämmen für die L- und H-DNA ein distinktes, aber verwandtes Muster ergaben. Physikalische Genkarten wurden mit mehreren Restriktionsendonucleasen für die Virusstämme OMI, S 295 C und

No.11 erstellt (Fleckenstein and Mulder, 1980; Bornkamm et al., 1976; Fleckenstein 1979).

Herpesvirus ateles (*H. ateles*) weist eine Genomstruktur auf, die im wesentlichen der von *H. saimiri* entspricht. *H. ateles*-Genome sind ebenfalls überwiegend M-DNA-Moleküle, bei denen eine nicht repetitive L-Region mit 38% G+C von terminalen Tandemrepetitionen (*H*-DNA mit 75% G+C) variabler Länge eingerahmt ist (Fleckenstein et al., 1978). *H. ateles* und *H. saimiri* besitzen zu 35% homologe L-DNA-Sequenzen. Die onkogenen Eigenschaften der beiden Virusstämme sind einander sehr ähnlich (Fleckenstein and Desrosiers, 1981), so daß in der vorliegenden Arbeit die Mehrzahl der Untersuchungen primär an Hand verschiedener *H. saimiri*-Stämme durchgeführt, und *H. ateles* dann verwandt wurde, wenn Rekombinationsexperimente zwischen den beiden Viren versucht wurden.

Kürzlich wurden 20 weitere wt-Virusisolate von *H. saimiri* durch Spaltungen mit HpaII, SacII, TaqI und anderen Restriktionsendonucleasen vergleichend analysiert (Desrosiers, pers. Mitteilung). Bei der Untersuchung von Kreuzhomologien zwischen bestimmten Restriktionsfragmenten zeigte sich, daß zwischen allen untersuchten Stämmen der größte Teil der L-DNA weitgehend zueinander homolog ist. Auffälligerweise zeigte sich, daß nur am linken Ende (bezüglich der unten dargestellten physikalischen Restriktionsenzym-Karten) in einem Abschnitt von etwa 3,5 md Basensequenzdivergenz besteht (Medvetzky et al., 1980). Die Blothybridisierungen wiesen darauf hin, daß alle untersuchten *H. saimiri*-Stämme in zwei Untergruppen eingeteilt werden können. Die entsprechenden L-DNA-Regionen aller Virusstämme innerhalb einer Gruppe zeigen Kreuzhybridisierungen, während keinerlei Basensequenzhomologien zwischen L-Regionen von

Viren aus verschiedenen Gruppen bestehen. Dies ist insofern bemerkenswert als der Verlust von Onkogenität nach Attenuierung in Zellkulturpassagen mit Veränderungen in dieser Region korreliert ist.

Zahlreiche Versuche waren unternommen worden, um Impfstoffe gegen *H. saimiri*-induzierbare Tumoren bei Neuweltprimaten zu entwickeln. Ein Teil der Experimente zielte darauf, *H. saimiri* durch permanente Zellkulturpassage zu attenuieren, um es in der Folge als experimentelle Lebendvakzine zu benutzen. Der Virusstamm 11-att wurde durch Serienpassage in Vero-Zellen bei 39°C aus Stamm No.11 wt-Virus erhalten (Schaffer et al., 1975). Mit Stamm 11-att infizierte Krallenaffen (*Saguinus oedipus*) entwickelten keine Tumoren. Sie bekamen Antikörper und das Virus kann durch Kokultivation mit permissiven Zellen aus zirkulierenden Lymphozyten noch vier Jahre nach Infektion nachgewiesen werden (Falk et al., 1980). Das attenuierte Virus schützt Pinselohrräffchen (*Callithrix jacchus*) vor Tumorentstehung durch nachträgliche Infektion mit Wildvirus (Wright et al., 1980). Krallenaffen entwickeln nach nachträglicher Infektion mit Wildvirus Tumoren. Die Überlebenszeit ist allerdings dreimal so lang wie die von gleichzeitig infizierten, ungeimpften Kontrolltieren (Falk et al., 1976). Die Analyse der viralen DNA von Stamm 11-att mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen ergab, daß ein DNA-Segment von 1,1 md am linken Ende der L-DNA deletiert ist. Es konnten keine anderen Genomänderungen gefunden werden. Das Genom von Stamm 11-att bleibt nach Passage des Virus in Zellkultur und nach Infektion in Marmosets stabil (Mulder et al., 1981). Der Stamm SMHI-att, der vom *H. saimiri*-Stamm SMHI abgeleitet wurde, erzeugt ebenfalls keine Tumoren in Krallenaffen oder Eulenaffen. Er hat ebenfalls eine Deletion am linken Ende der L-DNA. Außerdem weist der Stamm SMHI-att eine Inser-

tion von 7,2 md in der H-DNA auf. Diese Insertion ist eine inverse Repetition einer 3,6 md großen Region vom rechten Ende der L-DNA des Stamms SMHI (Mulder et al., 1981). Obwohl infizierte Krallenaffen Antikörper gegen späte Antigene des Virus entwickeln, war es bisher nicht möglich, infektiöses Virus in den Tieren nachzuweisen. Der Stamm SMHI-att scheint auch keinen Schutz vor nachträglicher Infektion mit Wildvirus zu gewährleisten (Daniel et al., 1979).

Bis heute konnte noch nicht aufgeklärt werden, warum die beiden Virusstämme SMHI-att und 11-att die Fähigkeit zur Tumorinduktion in Krallenaffen verloren haben. Als Mechanismus der Attenuierung wäre eine der folgenden Möglichkeiten denkbar. (1) Die attenuierten Stämme könnten die Fähigkeit verloren haben, ein oder mehrere transformierende Genprodukte zu synthetisieren; (2) es könnte ein Antigen synthetisiert werden, das dem Immunsystem des Wirtes erlaubt, Tumorentstehung zu verhindern; (3) es könnte möglich sein, daß ein virales Produkt, welches Suppressor-T-Zellen stimuliert, von den attenuierten Viren in nicht funktioneller Form synthetisiert wird.

Bei zahlreichen animalen Viren sind die Methoden der klassischen Genetik sehr hilfreich, um eine funktionelle Analyse bestimmter DNA-Abschnitte zu ermöglichen. Dies geschieht in der Regel mit Hilfe konditional-letaler Mutanten, insbesondere ts-Mutanten. Für *H. saimiri* wäre dieser methodische Zugang äußerst schwierig, da das Virus zu langsam wächst und ts-Mutanten zu Reversionen neigen (Schaffer et al., 1975). Aus diesem Grund habe ich in der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt, die es erlaubt, Rekombination zwischen verschiedenen Stämmen von *H. saimiri* zu konstruieren, ohne auf ein zeitraubendes biologisches Selektionssystem angewiesen zu sein. Das Verfahren beruht darauf, daß Rekombination nach Transfektion langer,

überlappender Restriktionsfragmente isoliert werden. Ziel der Arbeit war es, mit Hilfe solcher Rekombinanten Strukturproteine verschiedener H. saimiri-Stämme zu analysieren und zu kartieren, funktionelle Hinweise auf die onkogene DNA-Region zu finden und weitere Anhaltspunkte für den Replikationsmechanismus von H. saimiri zu erhalten.

B. Materialien

1. Zelllinien und Virusstämme

- OMK: Nierenzellen von Eulenaffen etabliert von Daniel et al., (1976)
- Herpesvirus saimiri:
Stamm S 295 C isoliert von Melendez et al., (1968)
Stamm No.11 isoliert von Falk et al., (1972)
Stamm HOT = OMI isoliert von Hunt et al., (1973)
Stamm 11-att isoliert von Schaffer et al., (1975)

2. Reagenzien

- Agarose Typ I
Sigma, St. Louis, USA
- Penicillin G und Stretomycinsulfat
Höchst AG, Frankfurt
- Kälberserum (fötal und neugeboren)
beide Gibco, Glasgow, Schottland
- Trypsin
Difco Laboratories, Detroit, USA
- PPLO-Agar
Difco Laboratories, Detroit, USA
- 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und (2,2-p-Phenylenbis-(5-phenyloxazol)
(POPOP)
Koch Light Laboratories Ltd., Colbrook, England
- Acrylamid, Ethidiumbromid, Ammoniumperoxodisulfat, Bromphenol-
blau-Na-Salz, Cäsiumchlorid, Mercaptoäthanol, N-Laurylsarkosin,
N-N-N-N-Tetramethyläthylendiamin (TEMED), N-N-Methylenbisacryl-

- amid, Na-dodecylsulfat (SDS), Rinderserumalbumin, Phosphorwolframsäure (PWS) alle Serva, Heidelberg
- Nonidet P-40 (NP-40)
Fluka, Buchs, Schweiz
 - Formvar
Geschenk von Zeiss, Deutschland
 - Säulenmaterial
DEAE-Cellulose
beide Whatman, England
DEAE-Sephacel
Sephadex
beide Pharmacia, Freiburg
Biogel A 0,5 M
Biogel P 10
beide Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA
 - radioaktive Nuklide ^3H , ^{35}S , ^{32}P , ^{14}C , ^{125}J
Amersham Buchler, Braunschweig bzw. NEN
 - Cytochrom C sowie andere Markerproteine
Sigma, St. Louis, USA
 - Proteasen
Serva, Heidelberg bzw. Miles, Frankfurt
 - Substanzen für die Bakterienzucht
Difco Laboratories, Detroit, USA
 - alle weiteren Substanzen ohne speziellen Bezugsnachweis
Merck, Darmstadt
Serva, Heidelberg
Sigma, München

3. Lösungen und Puffer

- MEM (minimal essential medium nach Eagle)
Grand Island Biological Company, Buffalo, USA
- MEM Methionin-frei
Seromed, München
- PBS (phosphate buffered saline)
8g NaCl; 2g KCl; 1,15g NaHPO₄ x 2H₂O; 0,2g KH₂PO₄ x 2H₂O;
0,167g CaCl₂ x 2H₂O; 0,1g MgCl₂ x 6H₂O
ad 1000 ml aqua dest.
- TT-33-Szintillator
40g PPO; 2g POPOP; 3,33l Triton-X-100; 6l Toluol
- Toluol-Szintillator
wie oben, nur ohne Triton-X-100
- VSB (virus standard buffer)
0,05 M Trishydroxymethylaminomethan (Tris); 0,01 M KCl;
0,005 M Äthylendiaminotetraessigsäure-dinatriumsalz (EDTA);
pH 7,8
- 50 x Tris-Acetat-Puffer für Agarosegele (Stammlösung)
2 M Tris pH 7,8; 0,25 M Na-Acetat; 0,05 M EDTA;
- 4 x Lower Tris Puffer für SDS-PAGE (Stammlösung)
1,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 8,8
- 4 x Upper Tris Puffer für SDS-PAGE
0,5 M Tris; 0,4% SDS; pH 6,8
- 4 x Tris-Glycin-Laufpuffer für SDS-PAGE
12g Tris; 57,6g Glycin; H₂O ad 1000 ml
- Sample-Puffer für SDS-PAGE
10% Glycerin; 5% β-mSH; 3% SDS; 62,5 mM upper Tris 4 x
- Fixierer für SDS-PAGE

40% Methanol; 40% H₂O; 10% Eisessig; 10% TCA

- 10 x Tris-Borat-Puffer für PAGE

1 M Tris pH 8,8; 1 M Borsäure; 0,02 M EDTA

- Lösung für die Fluorographie

300 ml DMSO; 60g PPO

- Lösung für Transfektionen

HEPES-buffered saline

130 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM Na₂HPO₄; 0,1% Glukose; 5 ug/ml
salmon sperm DNA; 40 mM HEPES; pH 7,05

- Methylcellulose-Medium für Plaque-Reinigung

1 x MEM; 2% Methylcellulose

- TMMK-Spaltungspuffer für die Restriktionsenzyme BamHI, EcaI,
HpaII, KpnI, SacII, XhoI (Stammlösung 10 x)

200 mM Tris pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 70 mM β-mSH; 150 mM KCl

- Cla-Spaltungspuffer für Restriktionsenzym ClaI (10 x)

80 mM Tris pH 7,6; 60 mM MgCl₂; 2 mM EDTA; 1,5 M NaCl

- Aos-Spaltungspuffer für Restriktionsenzym AosI (10 x)

200 mM Tris pH 7,5; 100 mM MgCl₂; 70 mM β-mSH; 800 mM KCl

- Hin f-Spaltungspuffer für die Restriktionsenzyme TaqI, PstI,
HindIII (10 x)

1 M Tris pH 7,8; 1 M MgCl₂; 1 M β-mSH;

- Sma-Spaltungspuffer für Restriktionsenzym SmaI (10x)

200 mM Tris pH 9,0; 100 mM MgCl₂; 150 mM KCl;

- Xba-Spaltungspuffer für Restriktionsenzym XbaI (10 x)

60 mM Tris pH 7,4; 1 M NaCl; 6 mM MgCl₂

- LB-Medium für die Bakterienzucht

5g Yeast Extract; 10g Bacto Trypton; 5g NaCl ad 1000 ml H₂O

- M9-Glucose-Medium

6g Na₂HPO₄; 3g KH₂PO₄; 0,5g NaCl; 1g NH₄Cl; 2g Glucose ad 1000 ml

4. Enzyme, Nukleinsäuren, Proteine

- Restriktionsendonucleasen
- AluI aus *Arthrobacter luteus*
- AoiI aus *Anabaena oscillarioides*
Geschenk von Adrian de Waard, Leyden
- *Bacillus amyloliquefaciens*
Bakterien wurden uns freundlicherweise von C. Mulder zur Verfügung gestellt
- ClaI aus *Caryophanon latum*
Boehringer, Mannheim
- EcoRI aus *Escherichia coli*
Geschenk von A. Rösch, Inst. f. Mikrobiologie, Erlangen
- *Enterobacter cloacae*
Bakterien wurden uns freundlicherweise von H. Mayer aus Braunschweig-Stöckheim zur Verfügung gestellt
- HindIII aus *Haemophilus influenzae*
Boehringer, Mannheim
- HpaII aus *Haemophilus parainfluenzae*
Boehringer, Mannheim
- KpnI aus *Klebsiella pneumoniae*
Geschenk von C. Mulder bzw. BRL Laboratories
- PstI aus *Providencia stuartii*
Geschenk von A. Rösch, Inst. f. Mikrobiologie, Erlangen
- SacII aus *Streptomyces achromogenes*
Geschenk von C. Mulder
- SaII aus *Streptomyces albus*
isoliert am hiesigen Institut von I. Müller
- *Serratia marcescens*

Bakterien von C. Mulder zur Verfügung gestellt

- TaqI aus *Thermus aquaticus*

Boehringer, Mannheim

- XbaI aus *Xanthomonas badrii*

Geschenk von A. Rösch, Erlangen

- XhoI aus *Xanthomonas holcicola*

Geschenk von C. Mulder

- *Xanthomonas malvacearum*

Bakterien von A. Rösch, Erlangen zur Verfügung gestellt

- Trypsin

Difco Laboratories, Detroit, USA

- Proteinase K

Merck, Darmstadt

5. Geräte, Laborhilfsmittel

- Visking Dialyseschlauch

Serva, Heidelberg

- Petrischalen

Greiner, Nürtingen

- Gelatine-Orangefilter

Eastman Kodak Co., Rochester, USA

- Whatman Filterpapier 3 MM GF-C

Whatman, England

- sterile Einmalfiltereinheiten

Millipore

- Spritzen, Kanülen

Sterican

- Zellkultur-Plastikzubehör

Nunc, Falcon

- Polaroid Landkamera MP 4
- UV-Lampe C51 254 nm
UV Products, USA
- Elektrophoreseausrüstung
Höfer Scientific Instruments, San Francisco, USA
im hiesigen Institut selbstgebaut von E. Fischer
- Zentrifugen
UJ III S, Heraeus Christ
J 6 B, Beckman Instruments
RC-2 B mit Rotoren SS 34 und GSA, Sorvall
- Ultrazentrifugen
L-3 50, L-5 50 mit Rotoren SW 27, SW 56, SW 60, SW 41, 50 ti,
TGA 50; airfuge; Beckman, Kontron
- Mikrofugen
Beckman, Runne, Eppendorf
- Szintillationszähler
TriCarb 3380 Packard; LS 7500 Beckman
- Spektralphotometer
PMQ II, Zeiss; Typ 250 Gilford;
- Lyophilisiergerät
Gardiner, USA
- Gefriertruhen
Revco, Harris, USA; Colora, Stuttgart
- Durchlichtmikroskop
Diavert, Leitz
- Refraktometer
Zeiss
- Elektronenmikroskop EM 10
Zeiss

- Hochvakuummanlage E 360 E
Edwards
- Kupfernetze für die Elektronenmikroskopie (200 Maschen/Netz)
Veco, Solingen
- Scientia-Filme für die Elektronenmikroskopie
Agfa Gevaert, Leverkusen
- Fraktionensammler
Colora, Abimed, Desaga, Deutschland
- Zellaufbrechgerät
Stansted, England
- Fermenter
Bender-Hobein, Deutschland
- Brutschränke
Heraeus, Deutschland
- Schlauchpumpe
Abimed, Düsseldorf
- Spannungsgerät
Camag, Schweiz
- Gelscanner
Joyce-Loebl, England
- Eppendorf -Thermostat
Eppendorf , Deutschland
- Kühlkammer für Säulen
Colora, Deutschland
- Durchflußmonitor
Isco
- Säulen
LKB, Deutschland

C. Methoden

1. Zellkultur

Alle Herpesvirus saimiri (H. saimiri)-Stämme sowie die erhaltenen Rekombinanten wurden auf Eulenaffen-Nierenzellen (OMK-Zellen) gezüchtet, die als Monolayer-Kulturen wachsen. Sie wurden in Roux-Flaschen gehalten; wurden die H. saimiri-Stämme in vivo radioaktiv markiert, wurden sie in Standard-Gewebekulturflaschen aus Plastik kultiviert.

Die Kultivierung erfolgte bei 37°C. Auf die Roux-Flaschen wurden ca. 100 ml MEM, auf die Lux-Flaschen ca. 30 ml MEM gegeben, dem vor Gebrauch 10% fötales Kälberserum bzw. 7,5% FKS und 5% Pferdeserum, 0,35g/l L-Glutamin, 100 000 Einheiten/l Penicillin, 0,1g/l Streptomycinsulfat zugesetzt wurde. Nach 4 Tagen wurden die Zellen mit neuem Medium versorgt, nach 1 Woche nach milder Trypsinbehandlung (0,25%) subkultiviert (Todaro et al., 1978).

2. Test auf Mycoplasmen

In regelmäßigen Abständen wurde sowohl die Zellkultur als auch die zur Infektion benutzten Virusstocks auf Mycoplasmenkontamination getestet. Dazu wurde ein Tropfen Kultur- bzw. Virusmaterial auf je eine 1% PPLO-Platte gegeben, die 20% Pferdeserum, 10% Hefeextrakt, essentielle Vitamine, 10 mM Arginin, 10 mM Glutamin und 0,5% D(+)-Glucose enthält. Nach sechs bis sieben Tagen Inkubation bei 37°C unter 95% N₂ und 5% CO₂ wurden die Platten mit Dienes' Lösung (Brown and Officer, 1968) gefärbt und mikroskopisch betrachtet. Als positive Kontrolle wurden Vero-Zellen, die eine Kontamination mit Mycoplasma orale Typ 1 aufweisen, mitgeführt. Es wurden

im gesamten Zeitraum der Arbeit keine Mycoplasmen-Kontaminationen beobachtet.

3. Virusvermehrung

Die OMK-Zellen wurden in knapp konfluentem Zustand mit Virus infiziert, normalerweise am 3. bis 5. Tag. Dazu wurde nach Abgießen des verbrauchten Mediums ca. 0,1-0,5 Plaque-bildende Einheiten pro Zelle der entsprechenden Virussuspension zugegeben. Nach 1 Stunde Adsorptionszeit bei Zimmertemperatur wurde mit 100 ml frischem MEM aufgefüllt, und die Zellen weiter bei 37°C gehalten. Nach etwa 10 Tagen war der cytopathogene Effekt (CPE) soweit entwickelt, daß die Viren geerntet werden konnten.

4. Radioaktive Markierung viraler Proteine

a. ³⁵S-Methioninmarkierung

Zur radioaktiven Markierung der OMK-Zellen in Lux-Flaschen (75 cm² Kulturfläche) wurden diese bis zum knapp konfluenten Zustand gezüchtet, mit Methionin-freiem MEM 6 Stunden weiter bei 37°C inkubiert, anschließend mit ca. 1-2 pfu Virus/Zelle 1 Stunde bei Raumtemperatur infiziert und danach mit MEM, das 50% des üblichen Methionin-Gehaltes sowie 5% FKS und 10 µ Ci/ml ³⁵S-Methionin enthielt, gefüttert. Nach 8-14 Tagen konnte das Virus aus dem Überstand gereinigt werden.

b. Markierung mit ³²P-Orthophosphat

Zur ³²P-Orthophosphat-Markierung wurden die OMK-Zellen wie unter a. beschrieben, mit Ausnahme der sechsständigen Hungerphase, infiziert und anschließend mit vollständigem MEM, das 50 µ Ci/ml ³²P-Orthophosphat enthielt inkubiert. Nach 8-14 Tagen konnte das Virus aus

dem Kulturüberstand gereinigt werden.

c. Markierung mit ^3H - und ^{14}C -Glucosamin

Die Infektion von OMK-Zellen erfolgte wie unter b. beschrieben.

In diesem Fall enthielt das Medium $2,5 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H - bzw. ^{14}C -Glucosamin.

5. Plaque-Reinigung viraler Partikel

Plaque-Reinigung der Virusstämme erfolgte unter 2% Methylcellulose. Dazu wurden OMK-Zellen in Plastikzellkulturschalen (60 x 15 mm) ausgesät, nach 3 Tagen mit virushaltigen Zellkulturüberständen verschiedener Verdünnungsstufen infiziert und mit MEM + 2% Methylcellulose überschichtet. Nach 5-7 Tagen Inkubation unter 5% CO_2 wurden einzelne Plaques mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in frischen Zellkulturen weiter passagiert.

6. Virusreinigung

Zunächst wurde der virushaltige Überstand von infizierten Zellkulturen durch Zentrifugation im GSA-Rotor bei 8 000 rpm für 20' bzw. 10 000 rpm für 15' im SS 34-Rotor von den Zellfragmenten befreit. Das Virus wurde durch Sedimentation im SW 27-Rotor bei 20 000 rpm für 90 Minuten angereichert. Nach Resuspension in VSB und gründlichem Homogenisieren im Dounce-Homogenisator wurde das virushaltige Material auf einen 15-30% (w/v) Sucrosegradienten geschichtet und im Spinco SW 27-Rotor bei 20 000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Die sichtbare Bande wurde abgezogen und das Virus anschließend bei 2000 rpm für 90 Minuten im SW 27-Rotor angereichert. In der Regel wurde das so erhaltene Virus bis zum weiteren Gebrauch bei -85°C eingefroren. Die Präparationstechnik wurde im Elektronen-

mikroskop überprüft.

7. Präparation von Virus-Nucleocapsiden

Nucleocapside wurden aus gereinigtem Virus durch 30 minütige Inkubation bei 37°C in Gegenwart von 1% NP 40 und 200 mM NaCl präpariert. Nucleocapside wurden entweder durch isopyknische Zentrifugation in CsCl oder durch Pelletierung bei 15 000 g für 15-20 Minuten in einer Runne-Zentrifuge von den gelösten Membranfragmenten getrennt. Die Nucleocapsidpräparationen wurden routinemäßig im Elektronenmikroskop auf Identität und Reinheit überprüft.

8. Elektronenmikroskopische Darstellung von Viruspartikeln und Nucleocapsiden

Kupfernetzchen für die Elektronenmikroskopie wurden mit 0,4% Formvar in Dioxan befilmt, getrocknet, mit Kohlenstoff bedampft und anschließend beglimmt. Die so vorbereiteten Netzchen konnten jetzt für das "negative staining" benutzt werden. Dazu wurde je 1 Tropfen Virusmaterial (aus der Virus- bzw. Nucleocapsidreinigung s. C 6/7), 1 Tropfen 2% Phosphorwolframsäure pH 7,2 auf eine Petrischale gegeben, die Netzchen zuerst ca. 30 Sekunden auf dem Virustropfen flottiert, auf einem Filterpapier abgetupft und ca. 15 Sekunden in PWS kontrastiert. Nach mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur konnten die Präparate im Elektronenmikroskop betrachtet werden.

9. Reinigung viraler DNA

Die Sedimente mehrerer Virusreinigungen wurden in 2 ml VSB aufgenommen, 1 Stunde bei 60°C mit 2% Sarkosyl NL lysiert und in ein Zentrifugenröhrchen über 8,7 ml einer CsCl-Lösung mit der Dichte

1,832 g/cm³ geschichtet. Im Spinco 50 ti-Rotor wurde dann 60 Stunden bei 20°C und 30 000 rpm ins Gleichgewicht zentrifugiert. Der Gradient wurde vom Boden durch eine 40 x 1,2 mm-Nadel in Fraktionen à 12 Tropfen in Eppendorf-Hütchen fraktioniert. Die Dichte jeder Fraktion wurde über den refraktiven Index, der DNA-Gehalt jeder Fraktion durch Extinktionsmessung im UV-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei nach der Gleichung von Felsenfeld und Hirschmann (1965) $1 \text{ OD}_{260} \hat{=} 50 \mu\text{g DNA/ml}$. DNA-haltige Fraktionen wurden nach H- und M-Genomen getrennt vereinigt und zwei Tage mit mehrmaligem Pufferwechsel gegen 20 mM Tris pH 8,5 dialysiert. Die Reinheit und Konzentration der erhaltenen DNA wurde durch Messen der UV-Adsorption zwischen 220 und 320 nm im Gilford Spektralphotometer bestimmt.

10. Reinigung bakterieller Restriktionsendonucleasen

a. BamHI aus *Bacillus amyloliquefaciens* (Roberts, 1978)

Die Bakterien wurden bei 37°C im Fermenter in 10 l LB-Medium zu einer $\text{OD}_{660} = 1,0$ herangezogen, anschließend bei 8 000 rpm im GSA-Rotor für 20 Minuten zentrifugiert und das Sediment in 20 mM Tris pH 7,5 10 mM β -mSH gewaschen und resuspendiert. Danach wurden die Bakterien im Stansted-Zellaufbrechgerät aufgeschlossen und anschließend für 2 Stunden im SS 34-Rotor bei 12 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine NaCl-Konzentration von 1 Mol/l eingestellt und mit 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM β -mSH, 1 M NaCl als Elutionspuffer in einer Biogel A 0,5 m-Säule (60 x 2,5 cm) aufgetrennt. Jede Fraktion wurde mit DNA des Bakteriophagen Lambda auf Enzymaktivität getestet. Die aktiven Fraktionen wurden dann auf 50% Glycerol gebracht und bei -20°C eingefroren.

b. EcaI aus Enterobacter cloacae (Roberts, 1978)

Die Bakterien wurden in angereichertem NB-Medium (10g Pepton, 3g Fleischextrakt, 5g NaCl, 3,5g Na₂HPO₄, 1,5g KH₂PO₄, 1g Glucose, 5 µg Thiamin pro Liter) bis zur späten log-Phase (OD₆₆₀ = 1,4) bei 37°C im Fermenter angezogen. Die Bakterien wurden anschließend in einer J6-B-Zentrifuge mit 4 500 rpm abzentrifugiert und das Sediment in Puffer A (10 mM K-Phosphat, 1 mM EDTA, 0,1% β-mSH, 0,1% Triton-X-100 pH 7,5) gewaschen und resuspendiert und anschließend im Stansted-Zellaufbrechgerät aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 19 000 rpm im SS 34-Rotor wurde der Überstand auf 1 M NaCl eingestellt. Die DNA wurde durch Zugabe von Streptomycinsulfat auf eine Endkonzentration von 1% ausgefällt und durch Zentrifugation wie oben sedimentiert. Der Überstand wurde gegen Puffer A dialysiert und anschließend auf eine DEAE 52-Säule (25 x 2,5 cm), die mit Puffer A äquilibriert war, gegeben. Die Säule wurde mit einem linearen Gradienten (0-0,5 M NaCl in Puffer A) eluiert und jede dritte Fraktion mit Lambda-DNA auf EcaI-Enzymaktivität getestet. Die aktiven Fraktionen wurden auf 50% Glycerol gebracht und bei -20°C gelagert.

c. SmaI aus Serratia marcescens (Roberts, 1978)

Die Bakterien wurden im Fermenter in LB-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₆₀ = 1,6 angezüchtet. Nach Zentrifugation bei 4 000 rpm in einer J6-B-Zentrifuge wurde das Sediment in PEM (10 mM K-Phosphat, 7 mM β-mSH, 1 mM EDTA pH 7,0) gewaschen und resuspendiert. Nach Aufbrechen im Stansted-Zellaufbrechgerät wurden die Zellfragmente 2 Stunden bei 20 000 rpm im SW 27-Rotor abzentrifugiert. Dem Überstand wurde PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und die DNA mit 0,5% Streptomycinsulfat (Endkonzentration) gefällt. Nach Zentrifugation bei 20 000 rpm für 1 Stunde im SW 27-Rotor wurde

der Überstand mit Ammoniumsulfat auf 50% Sättigung gebracht und nach 15 Minuten wie oben abzentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde auf 80% Sättigung gebracht, nach 15 Minuten Rühren im SW 27-Rotor bei 15 000 rpm für 30 Minuten abzentrifugiert, das Sediment in PEM plus 0,015% Triton-X-100 (PEMT pH 7,0) resuspendiert und anschließend gründlich gegen PEMT dialysiert. Das Dialysat wurde dann auf einer DEAE 52-Säure, äquilibriert mit PEMT, mit einem linearen Gradienten (0-0,5 M NaCl in PEMT) aufgetrennt, die aktiven Fraktionen an Hand von Spaltung mit Lambda-DNA bestimmt und vereinigt und von einer P 11-Phosphocellulosesäule, die mit PEMT pH 7,8 + 0,15 M NaCl äquilibriert war, mit einem linearen Gradienten (0,15-0,6 M NaCl in PEMT pH 7,8) eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden auf 20% Glycerol eingestellt und bei -85°C eingefroren.

d. XmaI aus Xanthomonas malvacearum (Roberts, 1978)

Die Bakterien wurden im Fermenter bei 32°C bis zu einer $\text{OD}_{660} = 1,5$ herangezogen. Die Bakterien wurden dann bei 8 000 rpm im GSA-Rotor abzentrifugiert und in 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM β -mSH gewaschen und resuspendiert. Nach Aufbrechen im Stansted-Zellaufbrechgerät wurden die Zellfragmente durch Zentrifugation bei 20 000 rpm für 2 Stunden im SW 27-Rotor entfernt und der Überstand auf 1 M NaCl eingestellt. Die DNA wurde durch Zugabe von Streptomycinsulfat auf eine Endkonzentration von 1% gefällt und bei 20 000 rpm für 1 Stunde im SW 27-Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde gegen PC-Puffer (10 mM K-Phosphat pH 7,4, 10 mM β -mSH, 0,1 mM EDTA, 10% Glycerol) dialysiert und das Dialysat auf eine mit PC-Puffer äquilibrierte DEAE-Sephacel-Säule gegeben. Nach Elution mit einem linearen Gradienten (0-0,5 M KCl in PC-Puffer) wurden die aktiven Fraktionen durch Spaltung von Lambda-DNA bestimmt, auf 50% Glycerol eingestellt

und bei -20°C gelagert.

11. Präparation von T_7 -Bakteriophagen für Markerproteine

Die T_7 -wt-Phagen und E. coli BB wurden mir freundlicherweise von J. Bauer aus Konstanz zur Verfügung gestellt.

E. coli BB wurden bei 37°C bis zur log-Phase in M9-Glucose-Medium herangezogen ($\text{OD}_{660} = 0,28$), auf 30°C abgekühlt und mit T_7 -Phagen mit einer Multiplizität von 10 infiziert. Nach 5 Minuten wurde $1 \mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin zugegeben und die Kultur bis zur Lyse bei 30°C unter ständiger Begasung mit gefilterter Luft inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf Eis mit NaCl auf 1 M eingestellt, 12 Stunden bei $+4^{\circ}\text{C}$ leicht gerührt, mit 3 000 g im SS 34-Rotor für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mit 60 g/l Polyäthylenglykoll (PEG) 6 000 versetzt und 24 Stunden auf Eis stehen gelassen. Danach wurden die gefällten Phagen bei 3 000 g im SS 34-Rotor für 60 Minuten abzentrifugiert, in 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M NaCl resuspendiert und mit CsCl auf eine Dichte von $1,3810 \text{ g/cm}^3$ eingestellt. Nach 24-stündigem Lauf im 50-ti-Rotor bei 35 000 rpm und 15°C wurde die sichtbare Bande abgezogen, gegen 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M NaCl dialysiert und in Portionen à 200 000 cpm bei -85°C eingefroren.

12. Präparation von DNA aus Lambda-Bakteriophagen

Der Lambda-lysogene Stamm J67 (CI857) wurde mir freundlicherweise von F. Schöffl aus Erlangen zur Verfügung gestellt.

Zur Induktion wurden bei 30°C bis zu einer $\text{OD}_{580} = 0,3$ gewachsene Bakterien für 10 Minuten bei 42°C inkubiert und anschließend bei 37°C bis zur totalen Lyse gehalten. Die Phagenreinigung erfolgte

wie unter Punkt C. 11 für T₇-Phagen beschrieben. Die dialysierten Phagen wurden dann mit Sarkosyl auf eine Endkonzentration von 2% gebracht, 60 Minuten bei 56°C inkubiert und die DNA wie unter Punkt C. 6 beschrieben isoliert.

13. Spaltung viraler DNA mit bakteriellen Restriktionsendonukleasen

Etwa 1 µg viraler DNA wurde mit einer vorher mit Lambda-DNA austrierten Menge des entsprechenden Restriktionsenzym so gespalten, daß das Enzym in mindestens zweifachem Überschuß im Reaktionsansatz vorhanden war. Die Spaltung wurde in dem für das jeweilige Enzym angegebenen Spaltungspuffer durchgeführt (s. B.3). Die Proben wurden anschließend in einem dreifachen Volumen absoluten Äthanol bei einer Konzentration von 0,21 M Na-Acetat über Nacht bei -20°C gefällt und dann für 5 Minuten in der Mikrofuge B zentrifugiert. Der Niederschlag wurde entweder in dem Auftragpuffer für das entsprechende Gelelektrophorese-System oder bei Mehrfachspaltungen in dem jeweiligen Restriktionsenzym-Puffer aufgenommen. Vor der weiteren Verwendung wurden die Proben bei 56°C für eine Stunde inkubiert. Für Transfektionsversuche wurden nach der Spaltung die Proteine durch Ausschütteln in einem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt, die DNA-Fragmente wie oben gefällt und anschließend im SW-56-Rotor bei 0°C und 35 000 rpm abzentrifugiert.

14. Transfektion mit viraler DNA

Zur Gewinnung von H.saimiri Rekombinanten wurden verschiedene H. saimiri-DNAs nach Restriktionsenzymspaltung und Äthanolpräzipitation in 500 µl Hepes-gepufferter Saline gelöst. Zugabe von CaCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 125 mM ergab innerhalb von 10 -

20 Minuten bei Raumtemperatur einen feinen sichtbaren Niederschlag. Danach wurde diese Lösung auf OMK-Zellkulturen, die zwei Tage nach Zellkultur-Passage in subkonfluentem Zustand waren gegeben. Nach 20-minütiger Adsorption bei Raumtemperatur wurden die Zellen in MEM mit 10% FKS weiterkultiviert. Ein- bis zweimal pro Woche wurden sie mit frischem Medium versorgt und mit einem Abstand von wenigen Tagen bis zu drei Monaten auf cytopathogene Veränderungen beobachtet. Die so erhaltenen Rekombinanten wurden über drei Passagen unter 2% Methylcellulose-Medium Plaque-gereinigt. Zur Kontrolle wurde mit ungespaltener DNA der Elternstämme in Parallelkulturen ebenfalls transfiziert. Diese ergaben in jedem Fall infektiöse Viren.

15. Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

a. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in Agarosegelen. Die Agarose wurde durch Kochen in Tris-Acetat-Puffer gelöst, auf 56°C abgekühlt, auf 0,5 µg/ml Eth.-Br. eingestellt und in einen horizontalen Gelapparat gegossen. Nach Überschichten des Geles mit Tris-Acetat-Laufpuffer einschließlich 5 µg/ml Eth.-Br. wurden die Proben, die in 10% Sucrose, 10 mM EDTA und 0,01% Bromphenolblau gelöst waren aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei einer Feldstärke von 2 Volt/cm über 16-24 Stunden bei ständiger Pufferumwälzung in horizontaler Richtung.

b. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in Tris-Borat-Puffer

Polyacrylamidgele wurden entweder als 7,5% Acrylamid/Bisacrylamidgele in Tris-Borat-Puffer oder als 5-25% Gradientengele in demselben Puffersystem gegossen. Die 7,5%-Gele enthielten 7,5% Acrylamid, 0,2% Bisacrylamid, 0,1% TEMED und 0,05% Ammoniumpersulfat. Die

Gradientengele enthielten neben den entsprechenden Anteilen an Acrylamid und Bisacrylamid 0,025% TEMED und 0,01% Ammoniumpersulfat. Die Proben waren in dem oben beschriebenen Puffer gelöst. Die Elektrophorese erfolgte in vertikaler Richtung bei 5 Volt/cm für 12-16 Stunden.

c. SDS-PAGE für DNA-Fragmente

Die Elektrophorese erfolgte hier im diskontinuierlichen System nach Lämmli (1970) in 7,5% bzw. 8,5% Polyacrylamidgelen. Lösungen und Puffer waren wie unter Punkt C. 17 beschrieben. Die DNA-Fragmente waren 10% Sucrose, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 1 mM EDTA und 0,01% Bromphenolblau gelöst. Der Einlauf der Proben bis zum Trenngel erfolgte bei 4 Volt/cm, der anschließende Lauf bei 12 Volt/cm. Nach dem Lauf wurden Agarosegele für 1 Stunde mit 1 µg/ml Ethidiumbromid in H₂O, Acrylamidgele für 5 Stunden in 5 µg/ml Ethidiumbromid in H₂O gefärbt. Danach wurden die Gele entfärbt und über einer UV-Lampe bei 254 nm Wellenlänge mit einer Polaroid MP-4 Landcamera photographiert.

16. Densitometrische Auswertung von Polaroid Typ 665-Negativen

Negative des Polaroid Typ 665-Negativfilmes wurden mit einem Joyce-Loebl-Gelscanner 200 mit dem Zusatz 201 für Plattengele bei 650 nm Wellenlänge gescannt und die Extinktion mit Hilfe eines internen Schreibers aufgezeichnet. Um die Intensität verschieden großer, mit Ethidiumbromid gefärbter DNA-Fragmente (Frag.z) nach der Photographie der jeweiligen Gele vergleichen zu können wurde folgende Korrekturformel angewandt:

$$\text{Gesamtextinktion } E_t = \sum_{z=A}^{\infty} E_z \times \frac{\text{MW Frag.A}}{\text{MW Frag.z}}$$

Der prozentuale Anteil einzelner Banden ergibt sich dann wie folgt:

$$\% \text{ Frag.z} = \frac{E_{\text{Frag.z}} \times \frac{MW_{\text{Frag.A}}}{MW_{\text{Frag.z}}}}{E_t} \times 100$$

17. SDS-PAGE viraler Proteine

Für die SDS-PAGE viraler Proteine wurde im diskontinuierlichen System nach Lämmli (1970) ein Gradientengel-System entwickelt, das sowohl im nieder- als auch im hochmolekularen Bereich eine gute Auftrennung von Proteinen mit nur geringen Unterschieden im Molekulargewicht ermöglicht. Der Gradient wurde aus einer 7,5% Acrylamid/0,2% Bisacrylamid-Lösung mit 0,06% Ammoniumpersulfat, 0,03% TEMED, 0,1% SDS in 375 mM Tris-HCl pH 8,8 und einer zweiten Lösung mit 20% Acrylamid/0,55% Bisacrylamid mit 12,5% Sucrose, 0,03% Ammoniumpersulfat, 0,015% TEMED, 0,1% SDS in 375 mM Tris-HCl pH 8,8 gegossen. Die eisgekühlten Lösungen wurden unter kontinuierlichem Mischen von unten in die Gelapparatur gepumpt. Dies dauerte etwa 16 Minuten. Auf die Gradienten wurden nach der Polymerisation Sammelgele aufgegossen. Diese bestanden aus 3% Acrylamid/0,08% Bisacrylamid mit 0,1% SDS in 125 mM Tris-HCl pH 6,8 und 0,05% Ammoniumpersulfat sowie 0,15% TEMED. 7,5%, 10% und 12,5% Gele wurden aus entsprechenden Lösungen gegossen, mit der Änderung, daß die Lösungen 0,1% Ammoniumpersulfat und 0,05% TEMED enthielten. Die Proteinproben wurden in 10% Sucrose, 5% β -mSH, 0,3% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 und 0,01% Bromphenolblau für 5 Minuten auf 96°C erhitzt und anschließend aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei Gradientengelen mit konstant 5 Volt/cm für 22 Stunden, Bei anderen Gelen wurde der Lauf im Sammelgel bei 5 Volt/cm und im Trenngel bei

15 Volt/cm. Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 198 mM Glycin und 0,1% SDS.

Für DATD vernetzte Gele wurden die gleichen Bedingungen verwandt wie oben beschrieben. Lediglich das Bisacrylamid wurde durch die 1,5-fache Menge an DATD ersetzt.

18. Indirekter Nachweis von viralen Glykoproteinen mit Hilfe von ^{125}J -Concanavalin-A (Con-A) (nach Burridge, 1978)

a. Jodierung von Con-A mit $\text{Na-}^{125}\text{J}$

2 mg Con-A wurden in einem Gesamtvolumen von 500 μl mit 5 mCi $\text{Na-}^{125}\text{J}$, 100 μg Chloramin T und 25 mg D-Mannose bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 Minuten durch Zugabe von 400 μg NaHSO_4 gestoppt und der ganze Ansatz auf eine Bio-Gel P-10-Säule, äquilibriert mit Puffer A (50 mM Tris-HCl pH 7,1, 0,01% NaN_3 , 250 mM MnCl_2 und 0,5 mM MgCl_2) gegeben. Nach Elution mit diesem Puffer in Fraktionen à 1,5 ml wurden diejenigen, die markiertes Con-A enthielten vereinigt und mit Hämoglobin auf eine Endkonzentration von 2,5 mg/ml eingestellt.

b. Imprägnieren des Geles

Ein 7,5-20% Gradientengel (s.C 17), auf dem der gleiche Satz von Proben zweimal aufgetrennt war wurde nach dem Entfärben mit Puffer A neutral gewaschen, der Länge nach geteilt und der zur Kontrolle bestimmte Teil über Nacht in Puffer A plus 20 mg/ml D-Mannose inkubiert. Beide Teile wurden dann mit $1,5 \times 10^9 \text{ cpm } ^{125}\text{J-Con-A}$ in Puffer A plus 1 mg/ml Hämoglobin überschichtet, wobei der Kontrolle 40 mg/ml D-Mannose zugegeben waren. Danach wurden sie unter häufigem Wechsel in Puffer A gewaschen. Dabei war bei der Kontrolle im Puffer A 50 mg/ml D-Glucose enthalten.

19. Proteolytischer Verdau viraler Proteine

Hierzu wurde für alle benutzten Proteasen (bis auf Thermolysin) exakt die von Cleveland et al. (1977) beschriebene Methode verwandt. Die Proteinbanden wurden sowohl aus Bisacrylamid- als auch aus DATD vernetzten Polyacrylamidgelen ausgeschnitten. Für den Verdau von Proteinen mit Thermolysin wurde zu allen Lösungen 1 mM CaCl_2 statt 1 mM EDTA zugegeben. Die Aktivität der jeweils benutzten Protease wurde mit dansyliertem Rinderserumalbumin, dessen Peptide wie die Proben aufgetrennt wurden, kontrolliert. Das Albumin wurde wie von Tussen and Kurstak (1979) beschrieben dansyliert und das Gel nach dem Lauf über einer UV-Lampe bei 254 nm mit einer Polaroidkamera photographiert.

20. Fixieren, Färben und Entfärben von SDS-Polyacrylamidgelen

Gele, die für die Autoradiographie oder Fluorographie bestimmt waren, wurden lediglich in einer Wasser-Methanol-Eisessig-Trichlor-essigsäurelösung (5:5:1:1) für 30 Minuten fixiert. Gele, in denen Proteine angefärbt werden sollten wurden eine Stunde in Wasser-Methanol-Eisessig (5:5:1) mit 0,1% Coomassieblau gefärbt und in der gleichen Lösung ohne Farbstoff entfärbt.

21. Vorbereitung von Polyacrylamidgelen für die Fluorographie

Zur Vorbereitung der Proteingele für die Fluorographie wurden die Gele nach dem Fixieren für 2 Stunden mit Dimethylsulfoxyd (DMSO) entwässert und anschließend 1 Stunde in 500 ml DMSO mit 20% PPO inkubiert. Das PPO, das ins Gel eindiffundiert war, wurde dann durch 30-minütiges Wässern ausgefällt (Bonner and Laskey, 1974). Bei einer weiteren Methode wurden die Gele nach dem Fixieren in

einem dreifachen Gelvolumen $\text{En-}^3\text{Hance}$ für 60 Minuten eingelegt und anschließend 30 Minuten gewässert, wobei sich in den Gelen ein weißer Niederschlag bildete.

22. Autoradiographie und Fluorographie

Fixierte Gele für die Autoradiographie sowie fixierte und imprägnierte Gele für die Fluorographie wurden auf einem Hoefer Gel-trockner bei 60°C unter Vakuum getrocknet und in Kassetten auf Kodak-XO-mat R und Kodak safety no screen F Filmen, sowie auf dem Ultrafilm von LKB exponiert. Die belichteten Filme wurden 5 Minuten in Roentogen entwickelt, 30 Sekunden in 2% Eisessig gestoppt, 5 Minuten fixiert und anschließend für 30 Minuten gewässert.

23. Zählung radioaktiver Proben

Wässrige $^{35}\text{S-}$, $^3\text{H-}$ und $^{14}\text{C-}$ Proben wurden bis zu einem Volumen in 10 ml TT-33-Szintillator direkt gezählt. $^{32}\text{P-}$ markierte Proben wurden wie bei Böhm et al. (1977) beschrieben behandelt und die Glasfaserfilter in 8 ml Toluol-Szintillator ausgezählt.

24. Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden genau nach der von Lowry et al. (1951) beschriebenen Methode durchgeführt.

25. Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

Ci	Curie
CPE	cytopathogener Effekt
cpm	Counts pro Minute

DATD	Diallyl-Tartardiamid
DNA	Desoxy-Ribonucleinsäure
FKS	Fötales Kälberserum
kbp	Kilo-Basenpaare
kd	Kilodaltons
md	Megadaltons
MEM	Minimal Essential Medium nach Earle
β -mSH	β -Mercaptoäthanol
μ	mikro
MW	Molekulargewicht
pfu	Plaque-bildende Einheit
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
ts	Temperatur-sensitiv
wt	Wildtyp

D. Ergebnisse

I. Strukturuntersuchungen an Wildtyp-Stämmen von H. saimiri

1. Untersuchungen der DNA mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen

Beim Erproben von etwa 35 Restriktionsendonucleasen zeigte sich, daß einige Enzyme sowohl in der L-DNA als auch in den repetitiven Sequenzen schneiden, während andere Enzyme jeweils nur in H-DNA- oder L-DNA-Sequenzen spalten. Das Restriktionsenzym SalI schneidet bei einigen H. saimiri-Stämmen weder in L-DNA noch in H-DNA. Entsprechend dieser Spaltungscharakteristik für H. saimiri-DNA wurden die Enzyme in vier Gruppen zusammengefaßt. Die Enzyme, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind entsprechend in Tabelle 1 aufgelistet.

Anzahl der Spaltstellen in H.saimiri DNA							
Gruppe	Restriktions- endonuclease	Stamm 11		OM1		S 295 C	
		L-DNA (b)	H-DNA (c)	L-DNA (b)	H-DNA (c)	L-DNA (b)	H-DNA (c)
I	Alu I	>40	≥7	>40	≥7	>40	≥7
	Rae III	>40	≥6	>40	≥5	>40	≥5
	Hinf	>40	5	>40	5	>40	5
	Hpa II	>35	≥8	>35	≥6	>35	≥6
	Pst I	>25	4	>25	5	>25	≥4
	Sac II	1	3	0	3	1	3
	Taq I	>40	1	>40	1	>40	1
II (a)	Aos I	6 (6)	0	8	0	6	0
	Bam HI	5 (5)	0	6	0	6	0
	Cla I	2 (2)	0	2	0	3	0
	Eca I	3 (3)	0	5	0	4	0
	Eco RI	13 (13)	0	10	0	14	0
	Kpn I	6 (5)	0	3	0	3	0
	Xho I	8 (8)	0	8	0	9	0
III	Sma I	0	4	0	4	0	3
IV (a)	Sal I	2 (2)	0	0	0	0	0

(a) In Klammern die entsprechende Anzahl der Spaltstellen für Stamm 11-att

(b) Anzahl der Spaltstellen in der L-DNA

(c) Anzahl der Spaltstellen in jeder H-DNA-Wiederholungs-einheit

Tab. 1: Übersicht über die Restriktionsendonucleasen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden (nach Fleckenstein und Desrosiers, 1981).

Für die Enzyme AseI, BamHI, KpnI, SalI und XhoI wurden physikalische Karten für die L-DNAs der *H. saimiri*-Stämme No.11, OMI und S 295 C erstellt (Fleckenstein and Mulder, 1980; Keil et al., 1980) (Abb. 3).

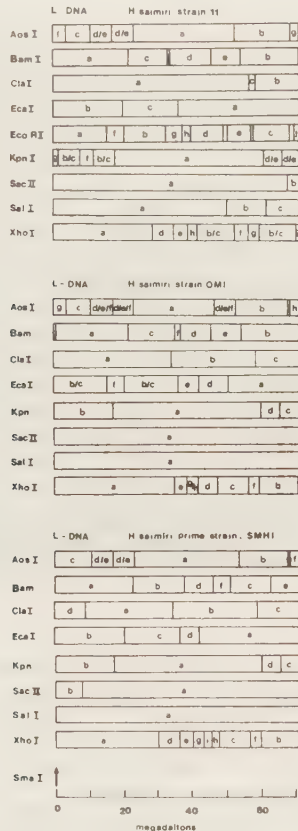


Abb. 3: Restriktionsenzymkarten für die L-DNA der drei verwendeten wt-Virusstämme von *H. saimiri* (C. Mulder, M. Koomey, G. Keil und B. Fleckenstein, unveröffentlicht).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für diese Stämme die Lage der Spaltstellen für die Enzyme ClaI und EcaI mit Hilfe von Mehrfachspaltungen

bestimmt. Dazu wurde M-DNA in verschiedenen Kombinationen mit ClaI bzw. EcaI, BamHI und SmaI gespalten und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4).



Abb. 4: Vergleichende Spaltungen der M-DNA von Stamm OMI und No.11 M-DNA und Auftrennung im 0,6% Agarosegel zur Kartierung der Spaltstellen von EcaI. (a) Lambda x HindIII, (b) OMI x BamHI, (c) OMI x BamHI x EcaI, (d) OMI x EcaI, (e) OMI x BamHI x SmaI, (f) OMI x EcaI x BamHI x SmaI, (g) OMI x EcaI x SmaI, (h) No.11 x BamHI, (i) No.11 x BamHI x EcaI, (j) No.11 x EcaI, (k) No.11 x BamHI x SmaI, (l) No.11 x BamHI x EcaI x SmaI, (m) No.11 x EcaI x SmaI, (n) Lambda x HindIII.

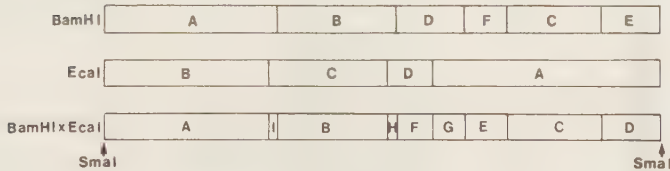
Die Molekulargewichte der Fragmente wurden mit Hilfe von Lambda x HindIII-Fragmenten als Molekulargewichtsmarker bestimmt (Tab. 2). Die physikalische Anordnung der Fragmente wurde jeweils durch Doppel- und Dreifachspaltungen für alle Virusstämme bestimmt. Die Spaltung

der M-DNA von Stamm 11-att mit ClaI und EcaI ergab für diese jeweils die gleichen Schnittstellen wie für die M-DNA von Stamm No.11.

S 295 C L-DNA-Fragmente nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

BamHISmaI		EcaISmaI		EcaIBamHISmaI		EcaISmaI		EcaIBamHISmaI	
Fragment	md	Fragment	md	Fragment	md	Fragment	md	Fragment	md
A*	21,95	A*	29,5	A*	20,5	A ^{II}		C+D+E+G	
B	14,9	B*	20,5	B	13,7	B ^{II}		A ^{II}	
C	12	C	14,75	C	12	C		B+I	
D	8,8	D	6	D*	7,7	D		F+H	
F*	7,7			E	5,7				
F	5,3			F	4,6				
				G	4				
				H	1,45				
				I	1,05				

* terminales Fragment



Tab. 2: Kartierung der Spaltstellen der Restriktionsendonucleasen EcaI in S 295 C L-DNA mit Hilfe von Mehrfachspaltungen mit den Enzymen BamHI und SmaI und die sich daraus ergebende physikalische Karte.

2. Analyse der Strukturproteine von Wildtyp-Stämmen von *H. saimiri*

a. Übersicht über die Strukturproteine

Die Viruspartikel (Abb. 5) wurden aus dem Zellkulturüberstand gereinigt, mit SDS degradiert, und die Proteine wurden auf 7,5-20% SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen elektrophoretisch aufgetrennt. Wurden die Proteine anschließend mit Coomassieblau angefärbt, ließen sich etwa 35 Proteinbanden erkennen, von denen einige wie zelluläre Proteine aus nicht infizierten Zellen wanderten (Abb. 6 a-d). Um Überladungseffekte in dem Polyacrylamidgel zu vermeiden, wurden mehrere

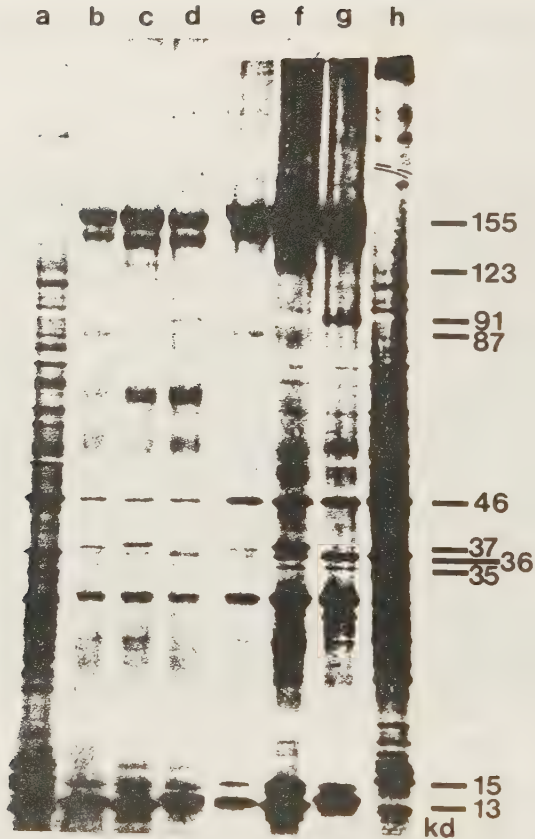


Abb. 6: Vergleich der Strukturproteine gereinigter Virionen der H.saimiri Stämme OMI, No.11 und S 295 C nach Auftrennung im 7,5-20% SDS-Gradientengel und Färbung mit Coomassieblau (a-d) bzw. Autoradiographie (e-h). (a,h) Proteine mock-infizierter Zellen, (b,e) Strukturproteine von Stamm OMI, (c,f) Strukturproteine von Stamm No.11, (d,g) Strukturproteine von Stamm S295 C.

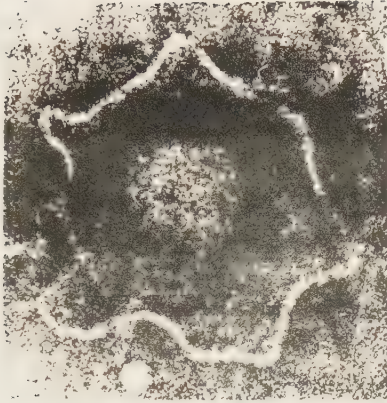


Abb. 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines gereinigten H. saimiri-Virions (Durchmesser ca. 250 nm).

unabhängige Methoden zur Darstellung der Strukturproteine vergleichend erprobt. Die Markierung der Proteine mit Dansylchlorid (Tussen and Kurstak, 1979) erwies sich als nicht geeignet, da die Fluoreszenz schnell nachließ und nicht alle Proteine im Gel nachweisbar waren. Gut geeignet war die Markierung mit tritiierten Aminosäuren und anschließender Fluorographie der Gele. In diesem Fall wurde aber der Vorteil einer Markierung mit langer Halbwertszeit durch eine relativ geringe spezifische Aktivität der synthetisierten Proteine aufgehoben. Als besonders vorteilhaft erwies sich für die zu bearbeitende Fragestellung die Markierung mit ^{35}S -Methionin. Hierbei wurden die besten Einbauraten erzielt, wenn die Zellen vor Infektion sechs Stunden in Methionin-freiem Medium mit 2% FKS an dieser Aminosäure verarmt waren. Nach Autoradiographie bzw. Fluorographie der getrockneten Gele ließen sich, wie bei der Färbung mit Coomassieblau, etwa 35 Proteine erkennen (Abb. 6 e-g), von denen einige nicht in jeder Virusreinigung nachweisbar waren. Die Molekulargewichte der

Marker proteins	MW [kd]
ϕ T ₇ Tail protein	150
Phosphorylase a	98
Phosphorylase b	92,5
Bovine serum albumin	69
IgG (H-chain)	50
Ovalbumin	49
ϕ T ₇ Major tail protein	38
Carbonic anhydratase	30
IgG (L-chain)	23,5
Cytochrome C	12,3

Tab. 3: Markerproteine zur Erstellung einer Eichkurve für die SDS-PAGE zur Molekulargewichtsbestimmung von H. saimiri-Strukturproteinen.

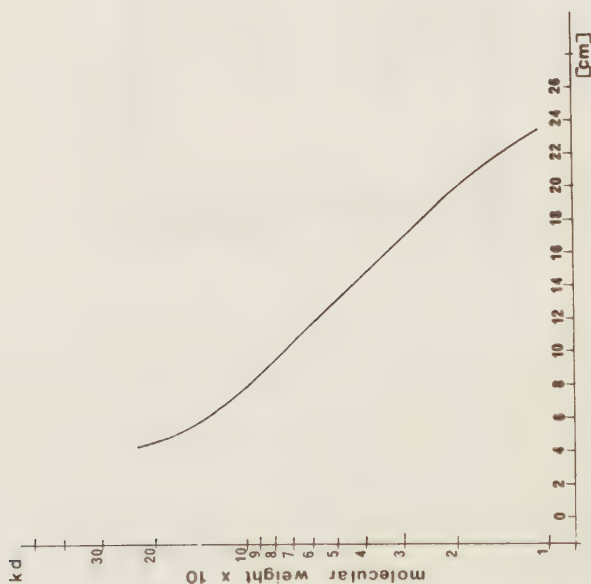


Abb. 7: Eichkurve zur Bestimmung der Molekulargewichte im 7,5-20% SDS-Gradienten-PAGE. Die Kurve wurde mit Hilfe der in Tab. 3 aufgeführten Markerproteine erstellt.

einzelnen Virusproteine wurden mit Hilfe der in Abbildung 7 dargestellten Eichkurve bestimmt. Tabelle 3 zeigt die zur Erstellung der Eichkurve verwendeten Markerproteine. In Abbildung 8 sind die bei jedem Virusstamm regelmäßig sichtbaren Strukturproteinbanden schematisch dargestellt. In Tabelle 4 sind die zu den jeweiligen Proteinen gehörenden Molekulargewichte angegeben.



Abb. 8: Schematische Darstellung der als Strukturproteine erkennbaren Proteine der drei wt-Virusstämme nach Auftrennung im 7,5-20% SDS-Gradientengel. Die Pfeile weisen auf unterschiedliche Proteine zwischen den Virusstämmen hin.

Nr.	MW (kd)		Modification
1	220		gly
2	155		
2a	155	E	gly
3	132		pho
4	123	E	gly
5	118		pho
5'	91		pho
5''	87		pho
6	111	E	gly
7	102		
8	96		
9	90	E	gly
10	84	E	gly
11	76		
12	69		
13	60		
14	55		pho
14'	57		pho
14''	55		pho
15	53	E	gly
16	46		
17	37		
17'	36		
17''	36,5		
18	36		
19	35	E	
20	31,5		
21	31	E	
22	18		pho
23	15		(pho)
24	13		pho
24'	13,5		pho
24''	13		pho

Tab. 4: Liste der in Abb. 8 schematisch dargestellten Strukturproteine von *H. saimiri*. Ein großes E hinter dem MW weist auf die Lokalisation des Proteins in der Hülle des Virus hin, ein gly bedeutet, daß das Protein glycosyliert ist, ein pho, daß das Protein phosphoryliert ist.

Zwischen den drei Stämmen waren mit Hilfe der ^{35}S -Methionin-Markierung nur drei Proteine zu identifizieren, die ein unterschiedliches Molekulargewicht aufweisen. Das Protein P 2, das entsprechend einem MW von 155 Kilodalton (kd) bandet, überdeckt in diesem Gelsystem

wahrscheinlich ein zweites Protein mit ca. 155 kd (S. Modrow, pers. Mitteilung; W. Bodemer, pers. Mitteilung).

Der Stamm 11-att weist genau die gleichen mit ^{35}S -Methionin markierbaren Strukturproteine wie der Stamm No.11 auf.

b. Darstellung von Phosphoproteinen

Phosphorylierte Strukturproteine von *H. saimiri* wurden durch Zugabe von ^{32}P -Orthophosphat zu den infizierten Zellkulturen markiert. Die Radioaktivität wurde unmittelbar nach der Infektion zugegeben. Die Auftrennung der viralen Proteine erfolgte wie oben beschrieben. Es ergaben sich 5 Phosphoproteine (Abb. 9). Eines dieser Proteine ließ einen weiteren Unterschied im Proteinmuster der wt-Isolate erkennen. Ein stark phosphoryliertes Protein wanderte beim Virusstamm S 295 C entsprechend einer Größe von 57 kd beim Stamm OMI und beim Stamm No.11 entsprechend einer Größe von 55 kd (Tab. 4, Abb. 8, Abb. 9). Die Markierbarkeit einzelner Phosphoproteine wechselte in auffälliger Weise mit der Geschwindigkeit des Infektionszyklus. Je rascher ein cytopathogener Effekt zur vollständigen Zerstörung des Zellrasens führte, um so besser war die Phosphorylierung, vor allem am P 24, nachweisbar.

c. Identifikation der Glycoproteine von *H. saimiri*

N-Acetyl-Glucosamin ist ein wesentlicher Bestandteil viraler Glycoproteine (Garoff and Simons, 1980; Klenk, 1980; Spear, 1980; Grines et al., 1980). Deshalb wurde versucht, die Glycoproteine von *H. saimiri* mit ^3H -Glucosamin bzw. ^{14}C -Glucosamin zu markieren. Allerdings zeigte sich das Problem, daß während der Infektion alle Strukturproteine radioaktiv markiert wurden. Wahrscheinlich beruht dieser

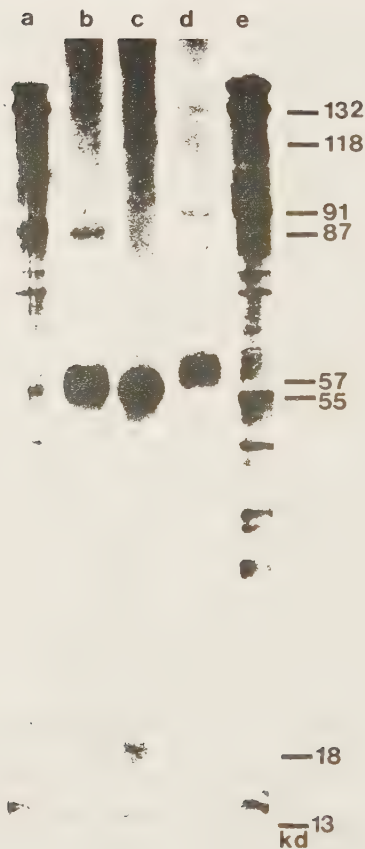


Abb. 9: Identifikation der Phosphoproteine unter den Strukturproteinen von *H. saimiri* nach SDS-PAGE ^{32}P -Orthophosphat und ^{35}S -Methionin markierter Virionen. (a) ^{35}S -Methionin markierter Stamm OMI, (b) ^{32}P -markierter Stamm OMI, (c) ^{32}P -markierter Stamm No.11, (d) ^{32}P -markierter Stamm S 295 C, (e) ^{35}S -markierter Stamm S 295 C.

Effekt auf einer Metabolisierung des jeweils angebotenen radioaktiven Zuckers. Aus diesem Grund wurde die Identifizierung der Glycoproteine mit einer indirekten ^{125}J -Markierung durchgeführt. Lectine wie Phytohämagglutinin und Concanavalin A (Con A) binden an eine

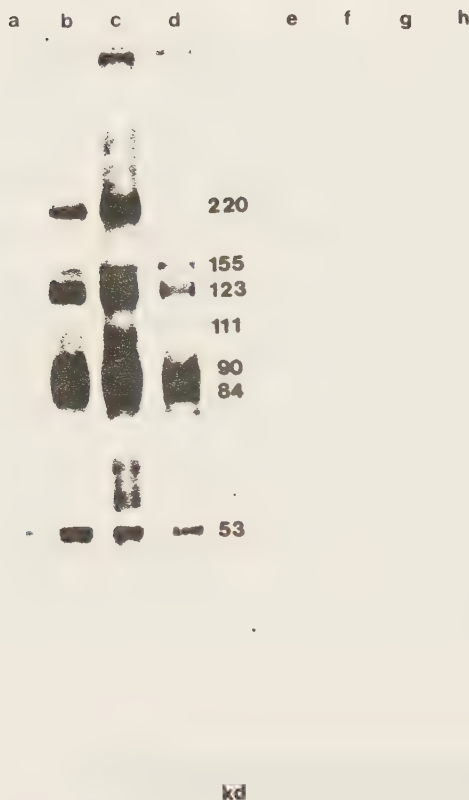


Abb.10: Auftrennung von Strukturproteinen gereinigter Virionen im SDS-PAGE mit anschließender indirekter Markierung von Glycoproteinen mit $^{125}\text{J-Con A}$. (a) Stamm No.11 (20 μg Gesamtprotein), (b) Stamm No.11 (100 μg Gesamtprotein), (c) Stamm OMI, (d) Stamm S 295 C, (e-h) wie (a-d), mit D-Mannose bzw. D-Glucose bei allen Markierungs- und Waschschritten. Die in Spur (c) und (d) erkennbaren Banden ohne MW-Angaben treten in anderen Versuchen nicht auf und sind wahrscheinlich Kontaminationen mit zellulären Proteinen.

Reihe von Kohlehydratseitenketten von Glycoproteinen. Wegen der bekannten Bindungsaffinität von Con A zu Mannose und Glucose, sowie deren sterisch verwandten Zuckern wurde versucht, diese Spezifität

zur autoradiographischen Darstellung der Glycoproteine von *H. saimiri* zu verwenden. Mannose ist ein wesentlicher Bestandteil viraler Glycoproteine (Klenk, 1980; Grines et al., 1980). SDS-Polyacrylamid-gele wurden nach Auftrennung gereinigter viraler Strukturproteine mit $^{125}\text{J-Con-A}$ inkubiert und gewaschen und durch Autoradiographie dargestellt. Die Abbildung 10 zeigt die vergleichende Darstellung der so markierten Glycoproteine von Stamm No.11, Stamm OMI und Stamm S 295 C. Bei allen drei wt-Virusstämmen ergaben sich die gleichen Molekulargewichte für die mit $^{125}\text{J-Con-A}$ markierbaren viralen Strukturproteine. Die Tatsache, daß Glucosamin und Mannose die Hauptbestandteile vieler, wenn nicht aller viraler Glycoproteine sind (Klenk, 1980), läßt es als wahrscheinlich erscheinen, daß mit dieser Methode alle Glycoproteine unter den Strukturproteinen von *H. saimiri* erfaßt werden.

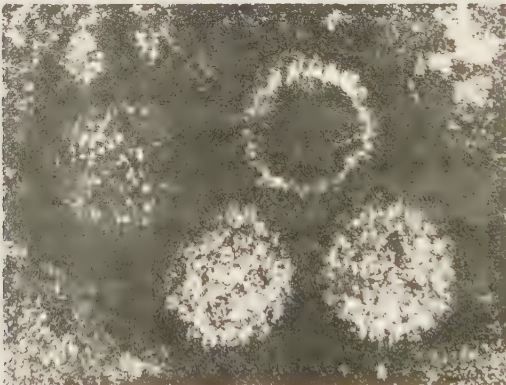


Abb.11: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *H. saimiri* Nucleocapsiden. Die Präparation wurde in Anwesenheit von NP 40 durchgeführt und enthielt keine eingehüllten Partikel.

d. Bestimmung der Hüllproteine

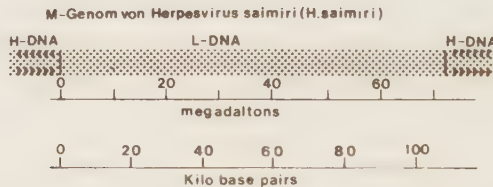
Nucleocapside (Abb. 11) wurden wie in Material und Methoden beschrieben aus gereinigten Viruspartikeln präpariert. Um Proteine des Hüllmaterials und der Nucleocapside zu differenzieren, wurden komplette Viruspartikel mit Nonidet P-40 (NP-40) partiell lysiert und die Proteine der löslichen und partikulären Fraktionen vergleichend elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine der löslichen Fraktion, in der Folge als Hüllproteine bezeichnet, sind in der Tabelle 4 mit einem E gekennzeichnet. Es erscheint bemerkenswert, daß fast alle Glycoproteine in der in der Virushülle lokalisiert sind und andererseits die Mehrzahl der Hüll-Strukturproteine von *H. saimiri* glycosyliert ist. Das einzige Glycoprotein, das nicht in der Hülle gefunden wurde, ist das Glycoprotein gp 220 (P1 in Abb. 8 und Tab. 4). Dieses fand sich als Bestandteil des Nucleocapsids.

II. Strukturanalyse der DNA von H. saimiri Rekombinanten

1. Rekombinanten aus intakter L-DNA mit einheitlichen H-DNA-Sequenzen aus Wildtypvirus

Intakte L-DNA aus M-Genomen, welche durch Spaltung mit SmaI oder SacII isoliert werden kann, ist nach Transfektion auf permissive Zellen nicht infektiös. Dies ist bemerkenswert, da die genetische Komplexität der nach Spaltung mit SmaI isolierten L-DNA fast identisch mit der Komplexität kompletter M-Genome ist. Dieser Befund führte zu dem Versuch, Infektiosität durch eine Mischtransfektion von intakter L-DNA und intakten H-DNA-Regionen zu rekonstruieren.

A)



B)

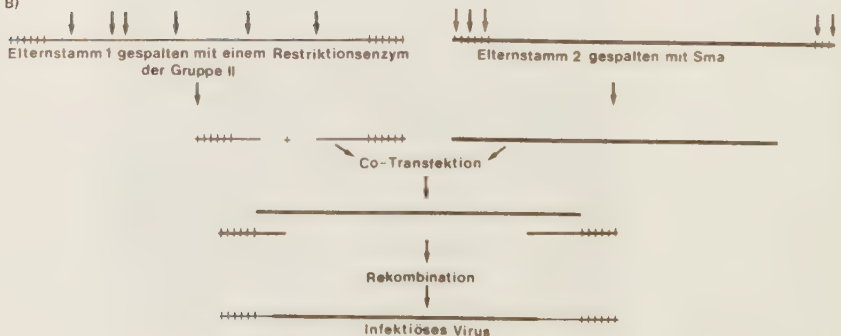


Abb.12: A) Schematische Darstellung des H. saimiri Genoms

B) Schematische Darstellung eines Transfektionsansatzes zur Gewinnung rekombinanter Virusstämme.

Nachdem sich zeigte, daß die Infektiosität wiederhergestellt werden kann, wurde in weiteren experimentellen Ansätzen untersucht, ob auch die L-Region eines Virusstammes mit der H-DNA eines anderen Stammes zu infektiösem Virus führen kann. Abbildung 12 zeigt ein Schema dieser Versuche. Diese Serie von Experimenten führte dazu, daß Rekombinanten isoliert wurden, deren L-Region überwiegend von einem Elternstamm stammen und deren H-Region vom anderen Elternstamm abgeleitet sind.

In ersten Versuchsansätzen wurde mit kompletten BamHI-Spaltprodukten eines H. saimiri-Stammes zusammen mit vollständigen SmaI Spaltprodukten eines zweiten H. saimiri-Stammes transfiziert. Nach ca. 2 bis 12 Wochen konnte infektiöses Virus aus den OMI-Zellen isoliert werden (Tab. 5).

Virus	innere L-Region	H-DNA	Zeit ^(a) (Tage)
RF 1	S 295 C	OMI	26
RF 2	S 295 C	11	21
RF 4	OMI	11	33
RF 6	11	S 295C	82
RK 2	11	OMI	42

Tab. 5: Isolierung rekombinanter Virusstämme aus OMK-Zellkulturen.

(a) Zeitdauer von der Transfektion bis zum ersten sichtbaren cytopathogenen Effekt.

Auf diese Weise wurden aus sieben Versuchsansätzen fünf rekombinante Virusstämme erhalten. Von jedem der so erhaltenen Isolate wurde die DNA gereinigt, mit Restriktionsenzymen geschnitten und die Restrik-

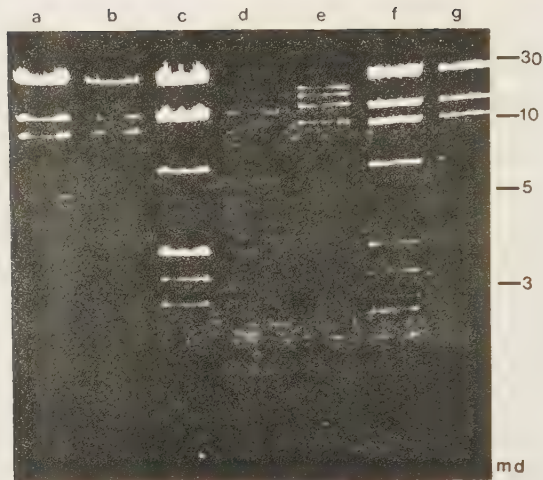


Abb.13: Vergleichende Spaltungen der M-DNA von wt-Viren und Rekombinanten mit XhoI und SmaI. (a) Stamm OMI, (b) RF 4, (c) Stamm No.11, (d) RF 6, (e) Stamm S 295 C, (g) RF 1. (Auftrennung der Fragmente in einem 0,6% Agarosegel.)

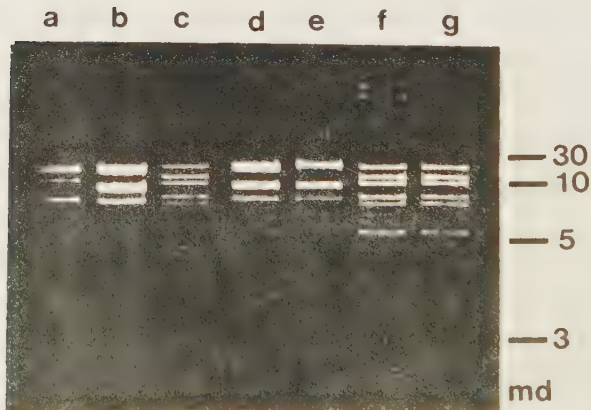
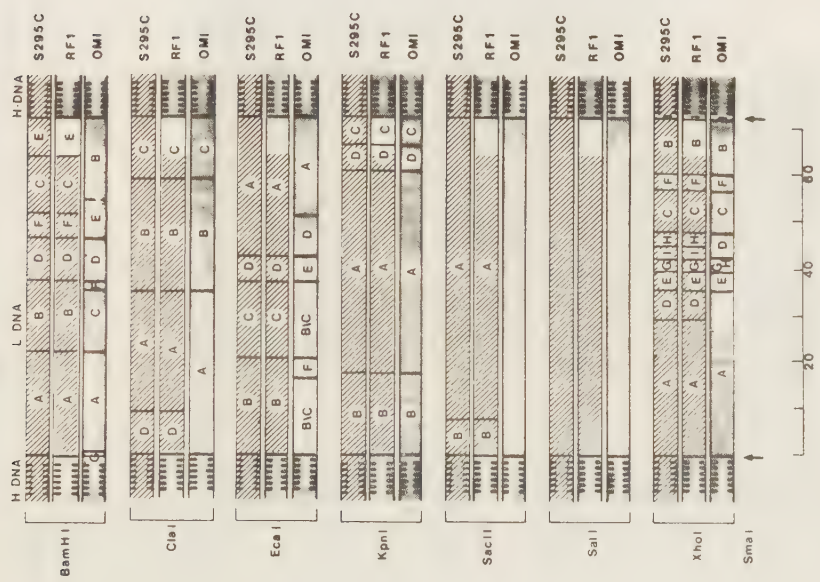
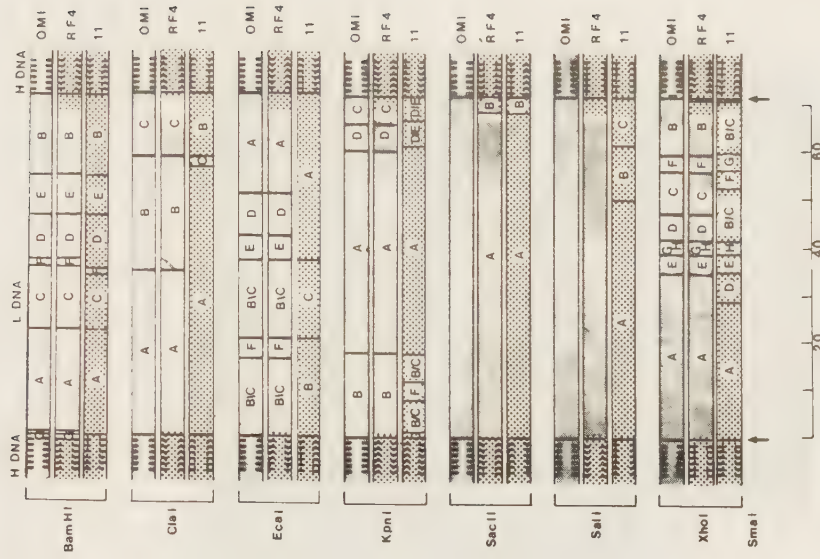


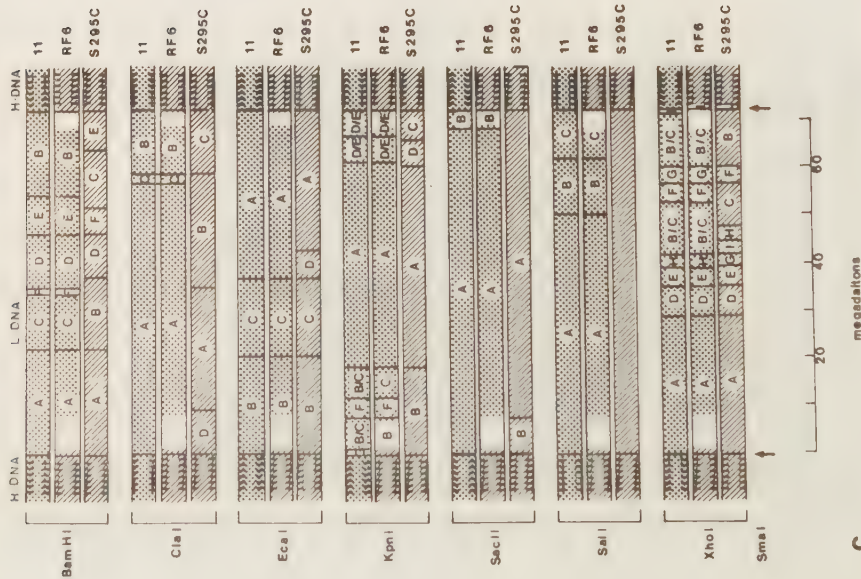
Abb.16: Vergleichende Spaltungen der M-DNA von wt-Viren und Rekombinanten mit BamHI und SmaI und Auftrennung der Fragmente in einem 0,6% Agarosegel. (a) Stamm OMI, (b) Stamm No.11, (c) RK 191, (d) RK 201, (e) RK 202, (f) Stamm S295 C, (g) RF 1.



a



b



d

megadaltons

C

Abb.14: Physikalische Karten für die Rekombinanten (a) RF 1, (b) RF4, (c) RF6, (d) RK 2, wobei die Rekombinanten für die einzelnen Restriktionsenzyme zwischen ihren Eltern angeordnet sind.

tionsfragmente elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 13, Abb. 16). Für jedes Isolat wurden die Spaltungskarten durch geeignete Kombinationen von Doppelspaltungen für die Enzyme BamHI, ClaI, EcaI, KpnI, SacII, SaII und XhoI angefertigt (Abb. 14 a-d). Das Isolat RK 2 konnte nur mit Enzymen der Gruppe I (Tab. 1) als Rekombinante identifiziert werden (Abb. 15), da alle verwendeten Enzyme der Gruppe II in der L-DNA von RK 2 ein Schnittmuster wie Stamm No.11 ergaben (Abb. 13 d) und SmaI bei den Stämmen OMI und No.11 die H-DNA-

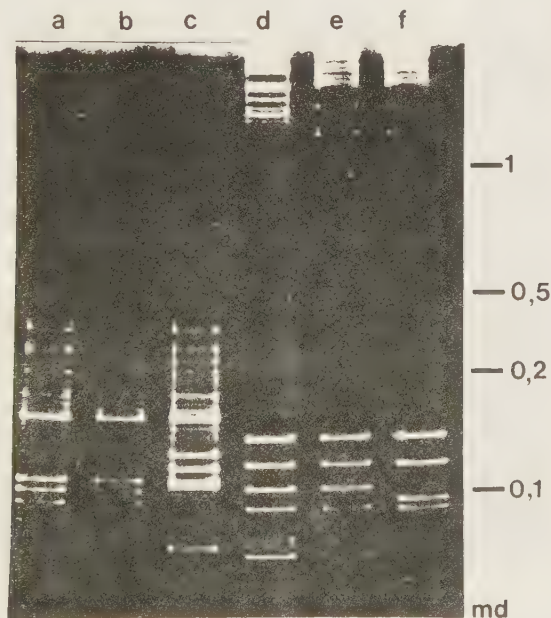


Abb.15: Vergleichende Spaltungen der L-DNA und der H-DNA der Rekombinanten RK 2 und der Elternstämme mit AluI und HpaII und Auftrennung der Fragmente in einem 5-20% Gradientengel. (a) Stamm OMI x AluI, (b) RK 2 x AluI, (c) Stamm No.11 x AluI, (d) Stamm OMI x HpaII, (e) RK 2 x HpaII, (f) Stamm No.11 x HpaII.

Abschnitte in gleiche Fragmente spaltet.

Die Spaltungskarten der Rekombinanten RF 1, RF 4, RF 6 und RK 2 machen es wahrscheinlich, daß die Rekombinante durch "crossing over" in entsprechenden, homologen Abschnitten der L-DNA-Sequenzen der jeweiligen Elternstämme entstanden sind. Die Rekombinante RF 2

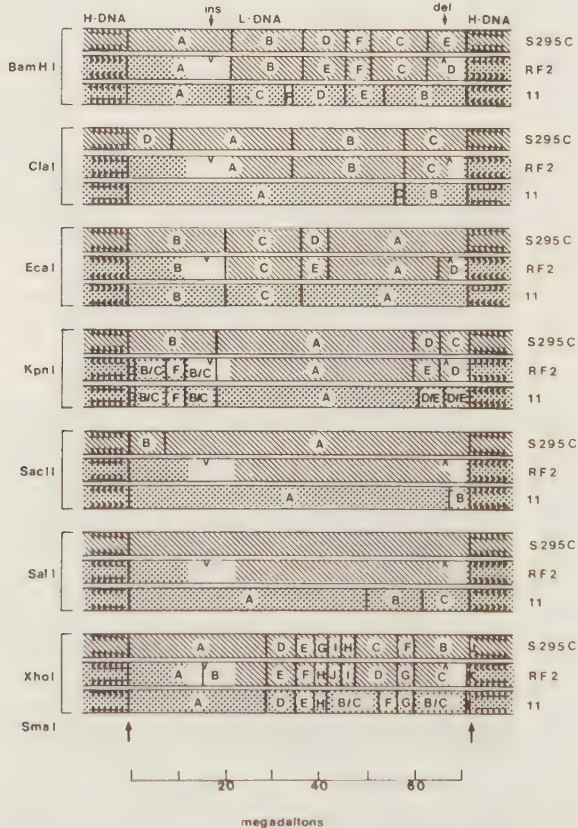


Abb.17: Physikalische Karte der DNA der Rekombinanten RF 2. Die Positionen einer 2,1 md großen Insertion und einer 1,5 md großen Deletion sind durch Pfeile markiert.

(Abb. 17), die aus Kotransfektion mit Stamm No.11-DNA, gespalten mit BamHI und Stamm S 295 C-DNA, gespalten mit SmaI entstanden ist, ergab ein von den oben beschriebenen Rekombinanten abweichendes Bild. Dieses Isolat hat eine Insertion von 2,1 md am linken Ende der L-DNA im rechten B/C-Fragment (genauer: im EcoRI F-Fragment) und eine Deletion von 1,5 md am rechten Ende im endständigen KpnI-Fragment, das

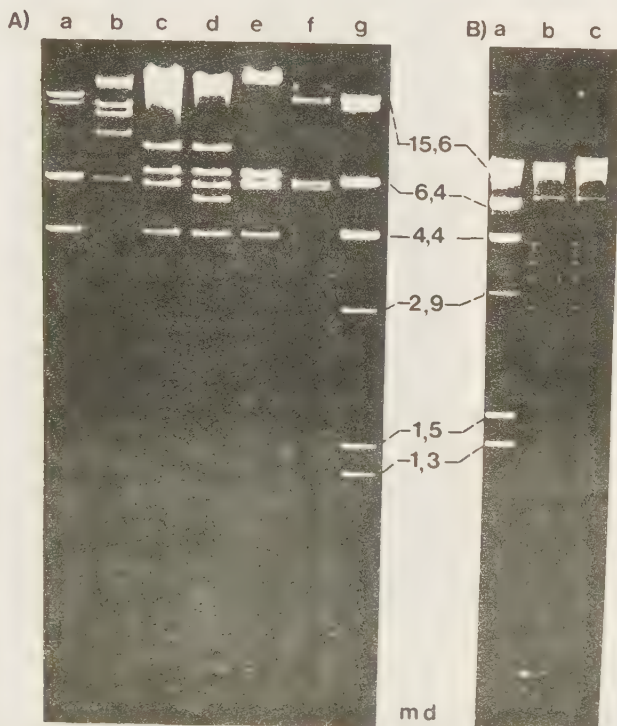


Abb.18: Spaltung der Rekombination RF 2 und der Eltern mit Restriktionsenzymen und Auftrennung der Fragmente in 0,6% Agarosegelen. (A) Spaltungen zum Nachweis der Insertion und der Deletion in RF 2. (a+g) Lambda x HindIII, (b) RF 2 x BamHI, (c) RF 2 x KpnI, (d) RF 2 x KpnI x SmaI, (e) Stamm No.11 x KpnI x SmaI, (f) S 295 C x SmaI x KpnI. (B) Spaltungen zur Bestimmung des terminalen XhoI-Fragments von RF 2. (a) Lambda x HindIII, (b) RF 2 x XhoI x SmaI, (c) RF 2 x XhoI.

dadurch zum E-Fragment wird (Abb. 18A). Darüberhinaus besitzt RF 2 eine zusätzliche XhoI-Spaltstelle, die weder der Stamm No.11 noch der Stamm S 295 C aufweist. Die neue Spaltstelle schneidet das XhoI A-Fragment der Elternstämme in ein A- und B-Fragment (Abb. 13e). Das A-Fragment ist terminal, da bei Spaltung von RF 2 M-DNA mit XhoI ohne SmaI das B-Fragment noch vorhanden ist und das A-Fragment durch die anhängende H-DNA-Region mit der hochmolekularen DNA wandert (Abb. 18B). Die Insertion ist in der Umgebung dieser neuen Spaltstelle lokalisiert. Es läßt sich aber nicht eindeutig bestimmen, ob sich die inserierte Sequenz im A- oder B-Fragment befindet oder ob sie auf beide Fragmente verteilt ist.

2. Rekombinanten aus Restriktionsfragmenten von L-DNA und einheitlicher H-DNA

In den weiterführenden Experimenten wurde untersucht, ob es auch möglich ist, Rekombinanten zu erhalten, bei denen jeweils längere L-DNA-Segmente von unterschiedlichen Elternstämmen abgeleitet sein können. Das Enzym KpnI spaltet für alle untersuchten H. saimiri-Stämme so , daß ein 42 md großes internes A-Fragment entsteht (Abb. 3). Diese KpnI A-Fragmente überlappen mit den terminalen BamHI Fragmenten von Stamm S 295 C und RF 1. Da die rechten terminalen BamHI-Fragmente dieser beiden Stämme nicht lang genug sind, um mit den KpnI-Fragmenten zu rekombinieren (Abb. 3 und Abb. 14a), ist es für die Entstehung eines vollständigen M-Genoms notwendig, am rechten Ende ein Überbrückungsfragment anzubieten. Als solches bot sich das rechte XhoI B/C-Fragment von Stamm No.11 an. Eine Kotransfektion von RF 1-DNA gespalten mit BamHI und Stamm No.11-DNA gespalten mit KpnI und SmaI und Stamm No.11-DNA gespalten mit XhoI und SmaI führte aus drei Parallelansätzen zur Isolierung von zwei Rekombinanten

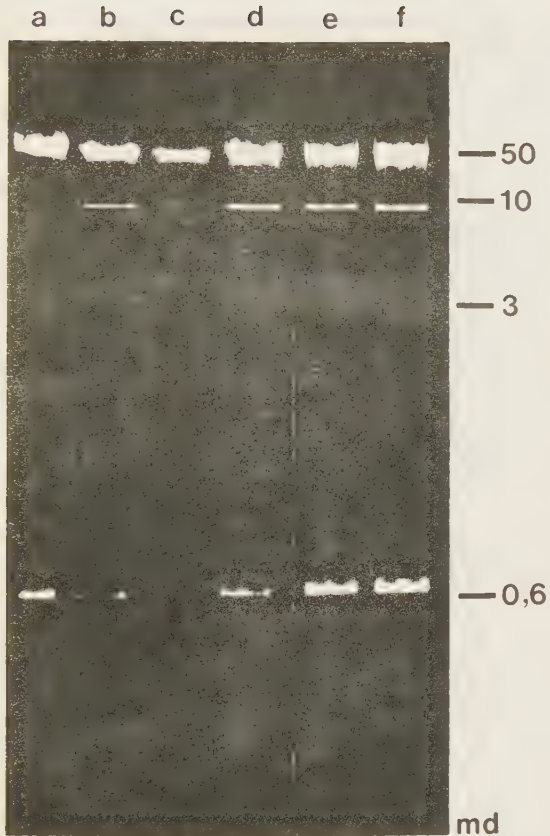


Abb.19: Vergleichende Spaltung der M-DNA von *H.saimiri* Rekombinanten und Elternstämmen mit *SacII* und Auftrennung der Fragmente in einem 0,6% Agarosegel. (a) Stamm No.11, (b) RK 191, (c) RK 201, (d) RK 202, (e) Stamm S 295 C, (f) RF 1.

Virus	innere L-Region	H-DNA	Zeit ^(a) (Tage)
RF 7	S 295 C	11	22
RF 8	S 295 C	11	23
RK 201	11	OMI	24
RK 202	11	OMI	28
RK 241	11	11	34

Tab. 6: Isolierung rekombinanter Virusstämme aus OMK-Zellkultur.

(a) Zeitdauer von der Transfektion bis zum ersten sichtbaren cytopathogenen Effekt.

(Tab. 6). Sie sind mit Restriktionsenzymen der Gruppe II nicht voneinander unterscheidbar (Abb. 16, Abb. 19, Abb. 20) und müssen die Sequenzen aller drei wt-Virusstämme in der L-DNA besitzen. Mit einigen hochspaltenden Enzymen der Gruppe I ließen sich leicht Unterschiede zwischen den beiden Virusisolaten finden. Notwendigerweise besitzen diese beiden Rekombinanten RK 201 und RK 202 noch beide SalI-Spaltstellen der Stamm No.11-DNA. Rekombinanten, für deren Isolierung das Stamm OMI bzw. Stamm S 295 C KpnI A-Fragment und die terminalen BamHI-Fragmente von Stamm No.11 angeboten wurden, besitzen nur noch die linke SalI-Spaltstelle. Aus fünf Versuchen, bei denen die DNA vom Stamm OMI mit KpnI und die DNA vom Stamm No.11 mit BamHI gespalten wurde, konnte kein infektiöses Virus isoliert werden. Demgegenüber konnten aus drei Ansätzen, in denen mit KpnI-Fragmenten vom Stamm S 295 C und BamHI-Fragmenten vom Stamm No.11 kointransfiziert wurde, zwei Rekombinanten isoliert werden (RF 7 und RF 8). Aus der Versuchsanordnung ergab sich notwendigerweise, daß

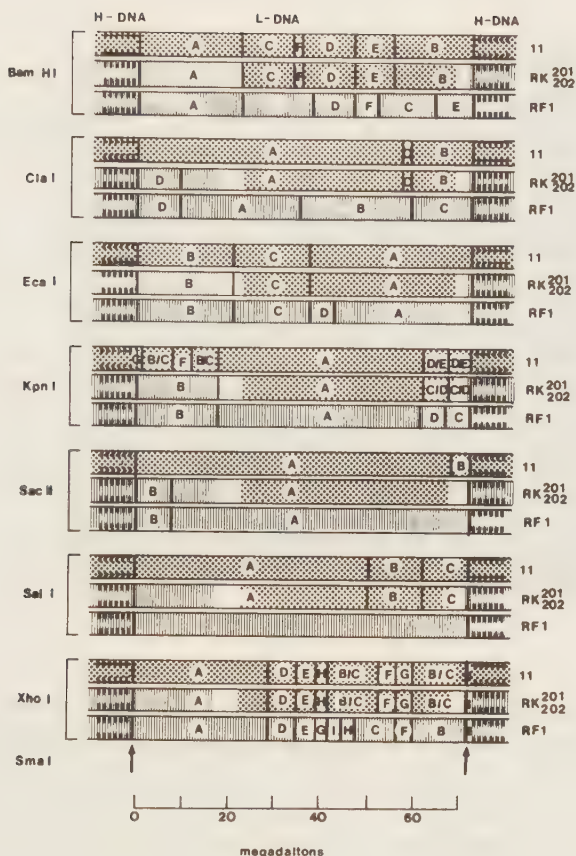


Abb.20: Physikalische Karte der Rekombinanten RK 201 und RK 202.

die Überkreuzungsstellen weiter im Inneren der L-Region liegen müssen, als dies bei den Rekombinanten die vorher beschrieben wurden der Fall war. Wie erwartet, besaß RF 8 (Abb. 21) nur mehr eine SalI-Spaltstelle. Dies konnte an Hand vergleichender Doppelspaltun-



Abb.21: Vergleichende Spaltungen der M-DNA von RF 7, RF 8 und der Elternstämme und Auftrennung der Fragmente in einem 0,7% Agarosegel. (a) RF 7 x BamHI x SmaI, (b) RF 8 x BamHI x SmaI, (c) Stamm S 295 C x BamHI x SmaI, (d) Stamm No.11 x Kpn I x SmaI, (e) RF 7 x KpnI x SmaI, (f) RF 8 x KpnI x SmaI, (g) Stamm S 295 C x KpnI x SmaI, (h) Stamm No.11 x SalI x SmaI, (i) RF 7 x SalI x SmaI, (j) RF 8 x SalI x SmaI, (k) Stamm No.11 x XhoI x SmaI, (l) RF 7 x XhoI x SmaI, (m) RF 8 x XhoI x SmaI, (n) Stamm S 295 C x XhoI x SmaI, (o) Stamm No.11 x SacII, (p) RF 7 x SacII, (q) RF 8 x SacII.

gen mit BamHI gezeigt werden konnte (Abb. 22).

Die Rekombinante RF 7 besitzt überhaupt keine SalI-Spaltstelle mehr (Abb. 21 und Abb. 22), obwohl diese Rekombinante für die anderen Enzyme der Gruppe II die gleichen Spaltmuster wie RF 8 aufweist (Abb. 21 und Abb. 23). Dies könnte dadurch zu erklären sein, daß ein zusätzliches Doppel-Crossover im linken KpnI D/E-Fragment an der Stelle der betroffenen SalI-Spaltstelle diese durch einen kurzen Sequenzaustausch eliminiert hat, oder daß eine Punktmutation die Erkennungssequenz verändert hat. Nichtsdestoweniger erwies sich diese Rekombinante als außerordentlich günstig, in einer weiteren Rekombinanten die linke SalI-Spaltstelle bei gleichzeitigem Fehlen der rechten Spaltstelle zu erhalten. Durch die Rekombination ist nämlich in RF 7, wie auch in RF 8, ein großes terminales BamHI A/B-Fragment am linken Ende der L-DNA entstanden. Dieses überlappt mit dem KpnI A-Fragment von Stamm No.11, allerdings nicht bis zur linken SalI-Spaltstelle. Außerdem enthält das KpnI A-Fragment die rechte SalI-Spaltstelle nicht mehr. Als weiteren Vorteil bietet das BamHI A/B-Fragment von RF 7 dem KpnI A-Fragment von Stamm No.11 homologe DNA-Sequenzen zur Rekombination an, so daß eine Kointransfektion von DNA aus Stamm No.11, gespalten mit KpnI und SmaI mit BamHI Fragmenten von RF 7-DNA eine Rekombinante ergeben sollte, welche nur noch die linke SalI-Spaltstelle enthält.

Aus einem solchen Versuch wurde dann eine Rekombinante (RK 241) isoliert, die genau das geplante SalI-Spaltmuster aufwies (Abb. 24), wie durch Mehrfachspaltungen gezeigt werden konnte. Für alle anderen Enzyme der Gruppe II ergibt die Rekombinante das gleiche Restriktionsspaltmuster wie Stamm No.11 M-DNA.

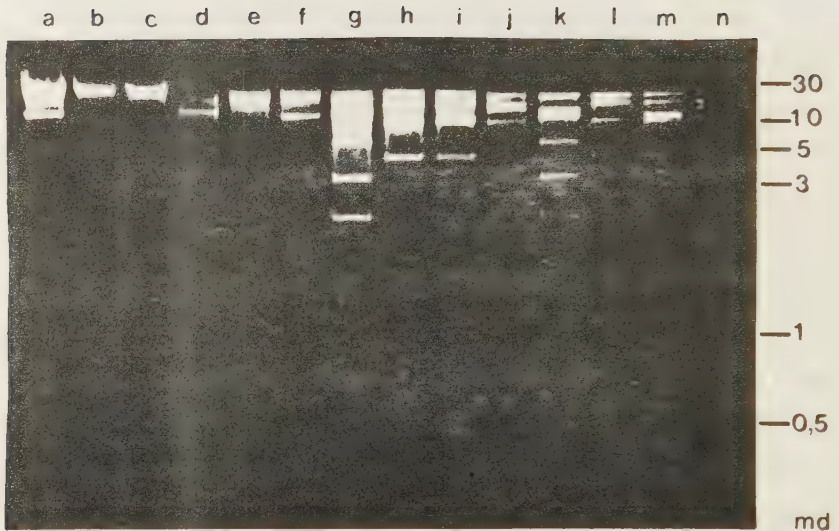


Abb.22: Vergleichende Spaltungen der M-DNA von RF 7, RF 8 und deren Elternstämmen mit SalI, BamHI und SmaI zur Untersuchung der SalI-Spaltstellen in den Rekombinanten und Auftrennung der Fragmente in einem 0,7% Agarosegel. (a) Stamm No.11 x SalI, (b) RF 7 x SalI, (c) RF 8 x SalI, (d) Stamm No.11 x SalI x SmaI, (e) RF 7 x SalI x SmaI, (f) RF 8 x SalI x SmaI, (g) Stamm No.11 x BamHI x SalI, (h) RF 7 x BamHI x SalI, (i) RF 8 x BamHI x SalI, (j) Stamm S 295 C x BamHI x SalI, (k) Stamm No.11 x BamHI x SalI x SmaI, (l) RF 7 x BamHI x SalI x SmaI, (m) RF 8 x BamHI x SalI x SmaI, (n) RF 8 x BamHI x SmaI, (n) Stamm S 295 C x BamHI x SalI x SmaI.

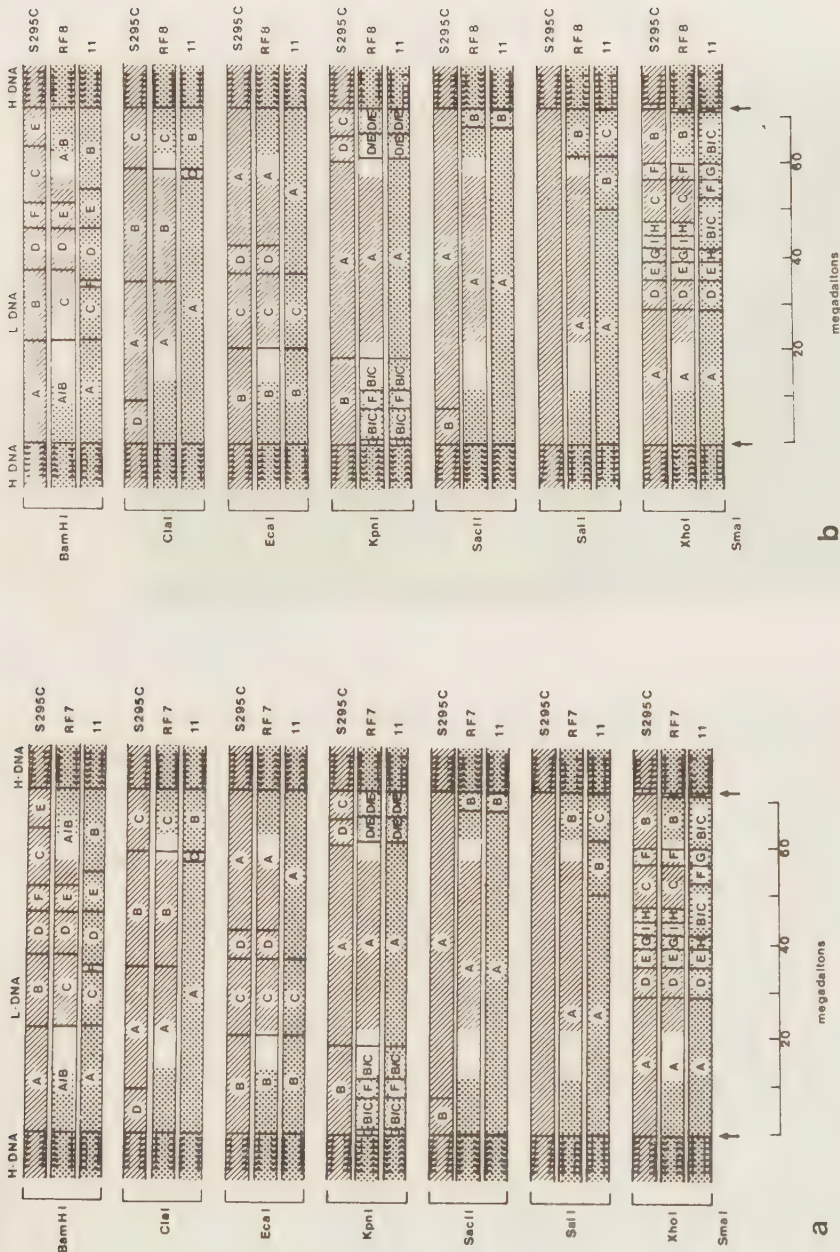


Abb.23: Physikalische Karten der Rekombinanten (a) RF 7 und (b) RF 8.

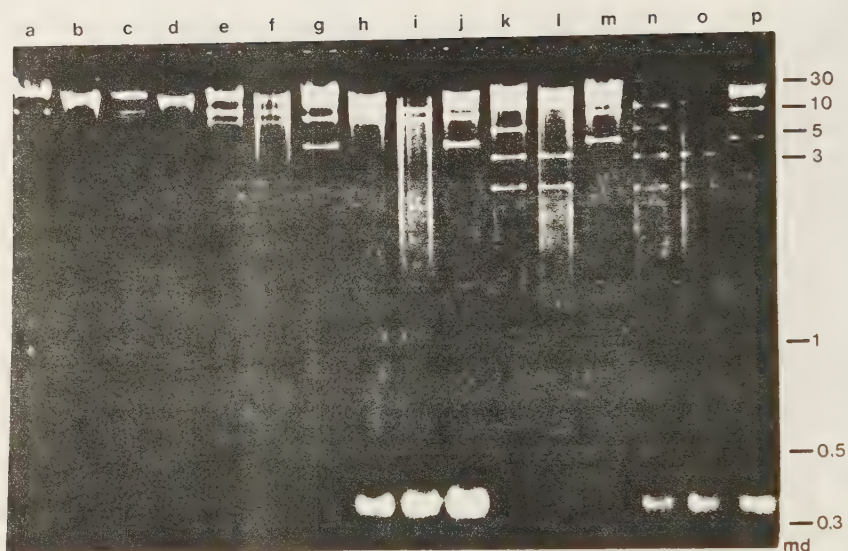


Abb.24: Vergleichende Spaltungen der M-DNA von RK 241 und der Elternstämme mit Sali, BamHI und SmaI zur Untersuchung der Sali Spaltstelle in der Rekombinanten und Auftrennung der Fragmente in einem 0,7% Agarosegel. (a) Stamm No.11 x Sali, (b) RK 241 x Sali, (c) Stamm No.11 x Sali x SmaI, (d) RK 241 x Sali x SmaI, (e) Stamm No.11 x BamHI, (f) RK 241 x BamHI, (g) RF 7 x BamHI, (h) Stamm No.11 x BamHI x SmaI, (i) RK 241 x BamHI x SmaI, (j) Stamm S 295 C x BamHI x SmaI, (k) Stamm No.11 x BamHI x Sali, (l) RK 241 x BamHI x Sali, (m) Stamm S 295 C x BamHI x Sali, (n) Stamm No.11 x BamHI x Sali x Sma I, (o) RK 241 x BamHI x Sali xSmaI, (p) Stamm S 295 C x BamHI xSali x SmaI.

3. Rekombinanten zwischen attenuiertem und Wildtypvirus

Der H. saimiri wt-Stamm No.11 und der daraus abgeleitete attenuierte Stamm 11-att unterscheiden sich in ihrer Genomstruktur dadurch, daß der attenuierte Stamm eine Deletion von ca. 1,1 md am linken Ende der L-DNA aufweist. Dieser Strukturunterschied zwischen attenuiertem und wt-Virus läßt es als wahrscheinlich erscheinen, daß der Verlust der onkogenen Eigenschaften mit dem Verlust der DNA-Sequenzen korrelierbar ist. Dies ist allerdings zunächst nicht gesichert, denn auch kleinere Mutationen in anderen Bereichen der L-DNA, welche bei der vergleichenden Restriktionsanalyse nicht erkannt

Sur Rekombination angebotene Fragmente	Anzahl der Versuche	Virusisolierung	Zeit ^(a) (Tage)	Bezeichnung
Stamm 11-att xBamHI + S 295 C xKpnI	5	—	>90	—
Stamm 11-att xSacII + S 295 C xBamHI	5	—	>90	—
Stamm 11-att xSmaI + S 295 C xBamHI	5	—	>90	—
Stamm 11-att xSall + S 295 C xEcoI	5	—	>90	—
Stamm 11-att xClaI + RF 28x BamHI x SmaI	3	—	>90	—
Stamm 11-att xClaI x SmaI + RF 8 x BamHI	3	—	>90	—
Stamm 11-att x BamHI + S 295 C x SmaI	3	—	>90	—
Stamm 11-att x ClaI + RE 241 x Sall x SmaI	1	1	34	RE 50
Stamm 11-att x BamHI + OM1 x SmaI	3	1	54	RE 42
Stamm 11-att x KhoI + OM1 x KpnI x SmaI + OM1 x BamHI	3	1	23	RE 141

(a) Zeitdauer von der Transfektion bis zum ersten sichtbaren CPE bzw. bis zur Degeneration des Zellrasens

Tab. 7: Transfektionsversuche um Rekombinanten zwischen Stamm 11-att und anderen Virusstämmen zu erhalten.

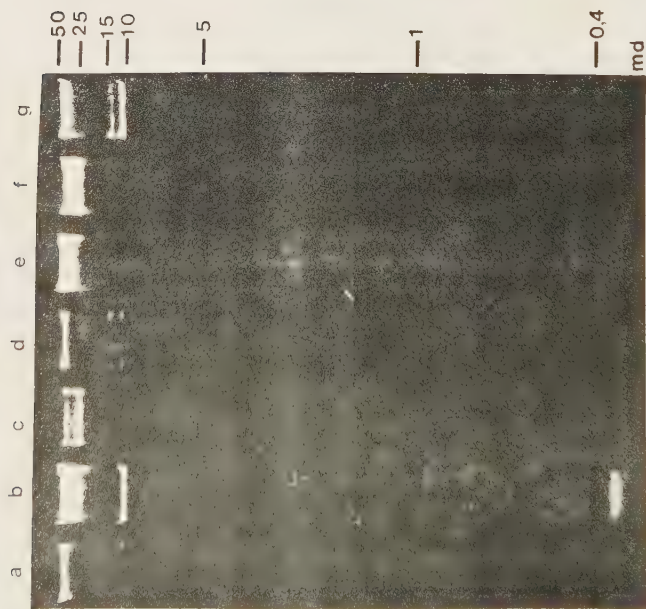


Abb.25: Spaltung von Rekombinanten und Elternstämmen mit SmaI und Auftrennung der Fragmente in einem 0,7% Agarosegel. (a) RK 65, (b) RF 8, (c) RK42, (d) Stamm No.11, (e) Stamm S295 C, (f) RK 50, (g) RK 48.

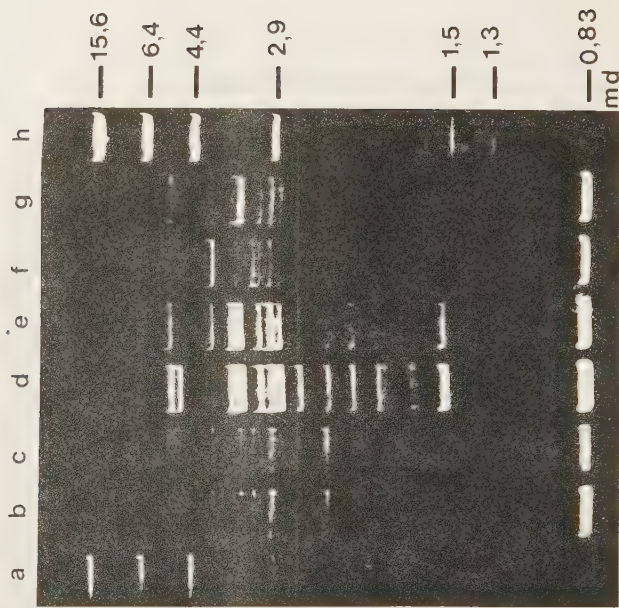


Abb.26: Spaltung von Rekombinanten und Elternstämmen mit TagI und Auftrennung der Fragmente in einem 0,9% Agarosegel. (a+h) Lambda x HindIII, (b) Stamm OMI, (c) RK141, (d) Stamm No.11, (e) Stamm 11-att, (f) RK 42, (g) RK 50.

werden, könnten für den attenuierten Phänotyp gänzlich oder teilweise verantwortlich sein. Aus diesem Grund wurden Versuche durchgeführt, Rekombinanten zu entwickeln, bei denen nur ein kleinerer Teil des M-Genoms einschließlich der Deletion am linken Ende vom attenuierten Virus abgeleitet ist, während der überwiegende Teil der DNA-Sequenz vom wt-Virus stammt. Bei dem Versuch, derartige Rekombinanten herzustellen, traten Schwierigkeiten auf, die bei Rekombinationsversuchen mit wt-Virus nicht beobachtet wurden. Die Transfektionseffizienz war geringer und in der Mehrzahl der Fälle konnten keine Rekombinanten isoliert werden (Tab. 7). Eine erste Rekombinante zwischen Stamm 11-att und einem anderen Virusstamm entwickelte sich aus einem Versuch, in dem mit ClaI gespaltener Stamm 11-att-DNA und mit SaII und SmaI gespaltener RK 241-DNA transfiziert wurde. Diese Kombination wurde gewählt, um zu klären, ob Rekombinanten zwischen Stamm 11-att-DNA und anderer DNA zu infektiösen Partikeln führen kann. Die aus diesem Ansatz isolierte Rekombinante RK 50 besitzt die Deletion von Stamm 11-att und weist wie RK 241 nur eine SaII-Spaltstelle auf (Abb. 25, Abb. 26). Dies bedeutete, daß Rekombination zwischen Stamm 11-att und DNA anderer Virusstämme in homologen Bereichen möglich ist. Um das Angebot an rekombinierbaren DNA-Sequenzen zu erhöhen, wurden in weiteren Versuchen immer 5 µg gespaltener wt-DNA zusammen mit 1 µg gespaltener Stamm 11-att-DNA auf die Zellen gegeben.

Aus dem Ansatz Stamm 11-att-DNA gespalten mit BamHI und Stamm OMI DNA gespalten mit SmaI wurde dann die Rekombinante RK 42 isoliert (Abb. 27). Diese hat die Deletion erhalten. Sie weist einen überraschend hohen Anteil an Stamm 11-att-Sequenzen in der L-DNA auf. Offensichtlich kam es bei der Entstehung der infektiösen DNA zu mehreren Überkreuzungen, da sich Stamm OMI und Stamm 11-att L-DNA-

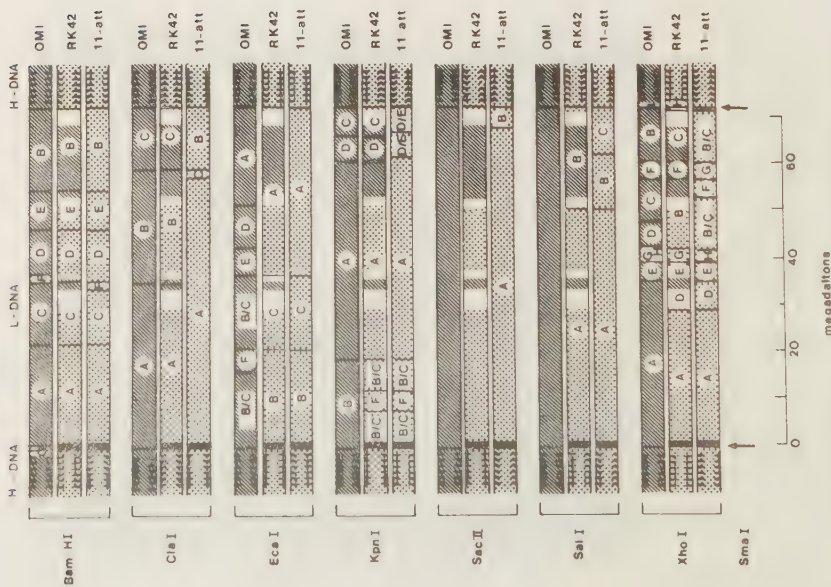


Abb. 27: Physikalische Karte der Rekombinanten RK 42.

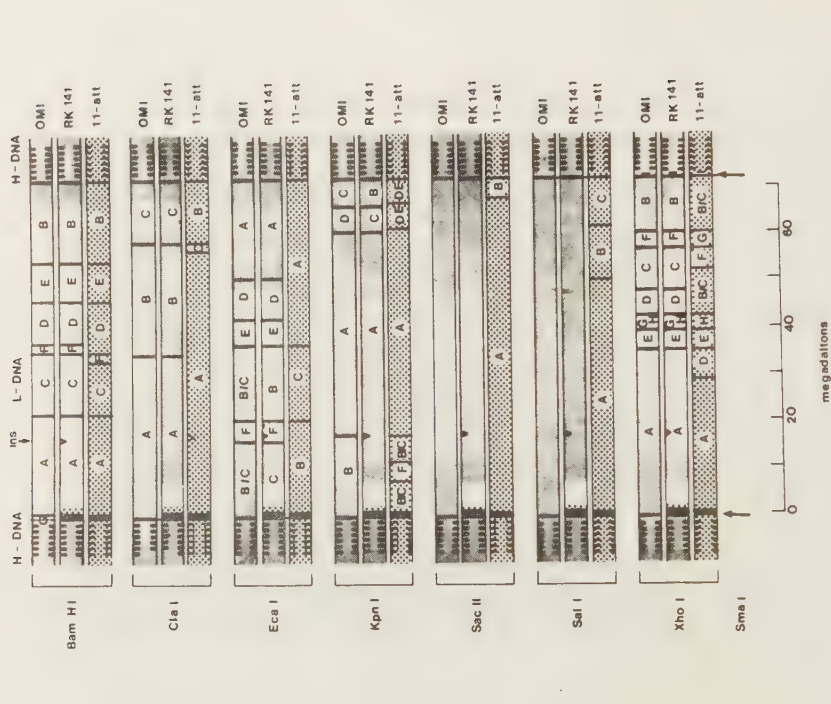


Abb. 28: Physikalische Karte der Rekombinanten RK 141.

Sequenzen in mehreren, nicht zusammenhängenden L-DNA-Abschnitten re-präsentiert finden. Ein weiteres Virusisolat das charakterisiert wurde, stammte aus einem Kotransfektionsversuch von 1 µg Stamm 11-att-DNA gespalten mit XhoI, sowie 5 µg Stamm OMI-DNA gespalten mit KpnI und SmaI und 5 µg Stamm OMI-DNA gespalten mit BamHI. Die L-DNA dieser Rekombinanten (RK 141) besteht zu mindestens 90% aus Stamm

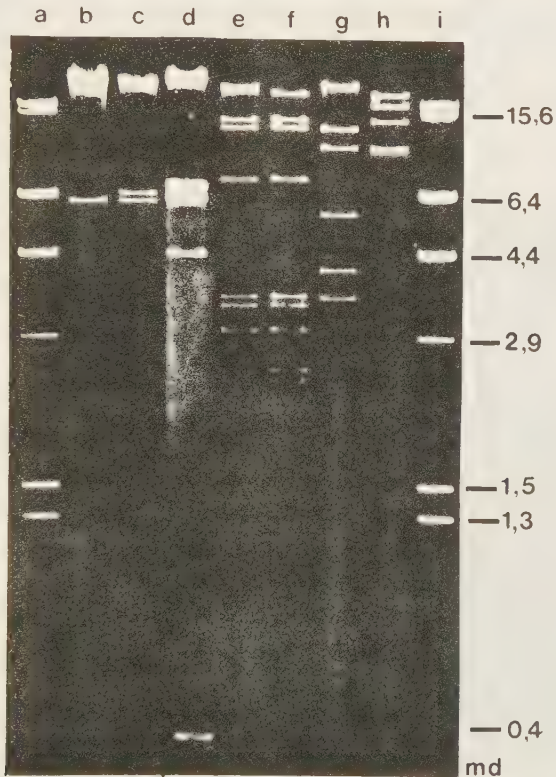


Abb.29: Spaltungen von RK 141 und Elternstämmen zur Untersuchung der terminalen Fragmente von RK 141 und Auftrennung der Fragmente im 0,6% Agarosegel. (a+i) Lambda x HindIII, (b) RK 141 x KpnI, (c) RK 141 x KpnI x SmaI, (d) Stamm No.11 x KpnI x SmaI, (e) RK 141 x BamHI x XhoI, (f) RK 141 x BamHI x XhoI x SmaI, (g) RK 141 x XhoI x SmaI, (h) RK 141 x BamHI x SmaI.

OMI-DNA (Abb. 28). Die H-DNA an beiden Seiten der L-DNA stammt von OMI, was durch Spaltungen mit PstI und HpaII nachgewiesen wurde. Eine Deletion von etwa 1 md aus Stamm 11-att-L-DNA dürfte erhalten geblieben sein. Dies zeigt sich durch folgende Ergebnisse:

- (1) Das BamHI A-Fragment von RK 141 ist terminal.
- (2) Die EcaI B/C-Fragmente von Stamm OMI lassen sich in ein B- und ein C-Fragment auflösen, wobei das terminale C-Fragment von RK 141 etwa 1 md kleiner ist als das B-Fragment (Abb. 29). Eine genaue Längenbestimmung der Deletion ist wegen der Größe dieser

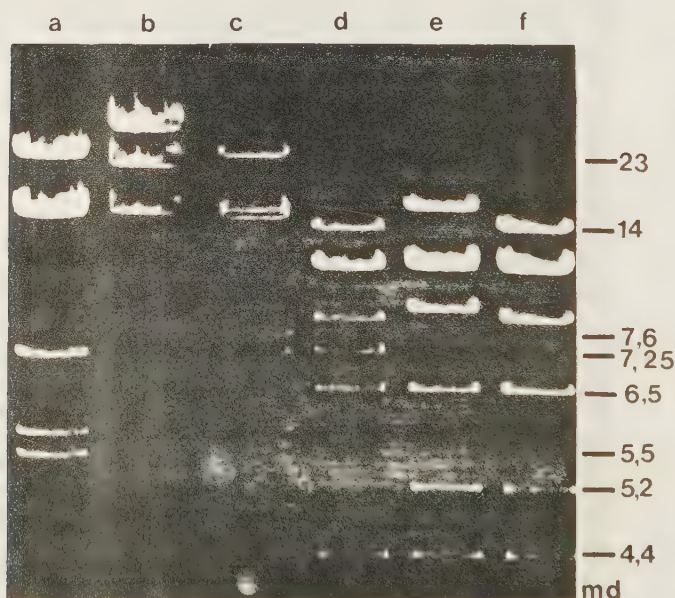


Abb.30: Spaltungen von RK 141 und Elternstämmen mit Restriktionsenzymen zur Bestimmung der Größe der Insertion in RK 141 und Auftrennung der Fragmente im 0,6% Agarosegel. (a) Stamm OMI x EcaI x SmaI, (b) Stamm 11-att x EcaI x SmaI, (c) RK 141 x EcaI x SmaI, (d) RK 141 x EcoRI x SmaI, (e) Stamm 11-att x EcoRI x SmaI, (f) Stamm OMI x EcoRI x SmaI.

Fragmente nicht möglich.

Die Rekombinante RK 141 hat neben der Deletion noch eine Insertion im EcaI F-Fragment (Abb. 30). Diese Insertion von etwa 2 md liegt auch im EcoRI F-Fragment und damit im Bereich der linken KpnI-Spaltstelle von Stamm OMI. Diese Spaltstelle ist in der Rekombinante nicht erhalten geblieben. Bemerkenswert ist, daß hier das gleiche EcoRI-Fragment von einer Insertion von ca. 2 md betroffen ist wie die Rekombinante RF 2, die allerdings die KpnI-Spaltstelle erhalten hat. Welcher Natur die inserierte DNA ist, ob sie aus anderen L-DNA-Bereichen stammt oder eine Duplikation, entstanden durch ungleiches "crossing over" z.B. an repetitiven Sequenzen ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

Die biologische Austestung der onkogenen Eigenschaften dieser Rekombinante in Versuchstieren (Tamarin-Marmosets, Krallenaffen, Eulenaffen) wird noch einige Monate in Anspruch nehmen. Die rekombinanten Virusstämme wurden dazu L. Falk im Primatenzentrum der Harvard Medical School zur Verfügung gestellt. Erste Resultate aus dieser Studie werden in Kürze erwartet.

4. Rekombinanten mit verschiedenen H-DNA-Regionen

Die repetitiven Einheiten der H- und M-Genome von H. saimiri wt-Iso-laten lassen sich mit Hilfe einiger Enzyme der Gruppe I (Tab. 1) deutlich unterscheiden. Die Funktion der H-DNA ist nicht geklärt und alle bisher vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß die H-DNA zwar nicht transkribiert wird, aber eine Rolle bei der Replikation des Virus spielt. Um dafür weitere Hinweise zu erhalten, wurde versucht, rekombinante Virusstämme mit unterschiedlichen H-DNA-Einheiten zu erhalten. Aus einem Kotransfektionsansatz von Stamm OMI-

DNA, gespalten mit ClaI, und Stamm No.11-DNA, gespalten mit KpnI, wurde die Rekombinante RK 48 isoliert, die H-DNA-Sequenzen von beiden Elternstämmen aufweist. Die L-DNA von RK 48, die durch vergleichende Spaltungen mit Enzymen der Gruppe II analysiert wurde, zeigt eine abwechselnde Folge von Stamm No.11 und Stamm OMI-Sequenzen (Abb. 31). Der prozentuale Anteil der H-DNA der Elternstämmen an den

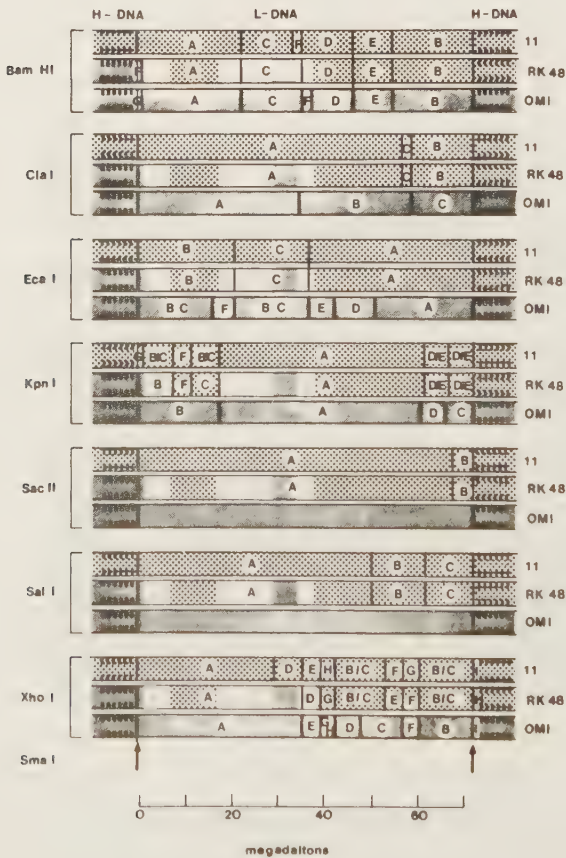


Abb.31: Physikalische Karte der Rekombinanten RK 48

repetitiven Einheiten der H-DNA in H- und M-Genomen von RK 48-DNA wurde mit Hilfe densitometrischer Auswertung von Negativen photographierter SDS-Polyacrylamidgele errechnet (Abb. 32). Für RK 48 ergibt sich daraus, daß ca. 60% der H-DNA-Einheiten vom Stamm OMI und 40% der H-DNA vom Stamm No.11 stammen. Die Rekombinante RK 191

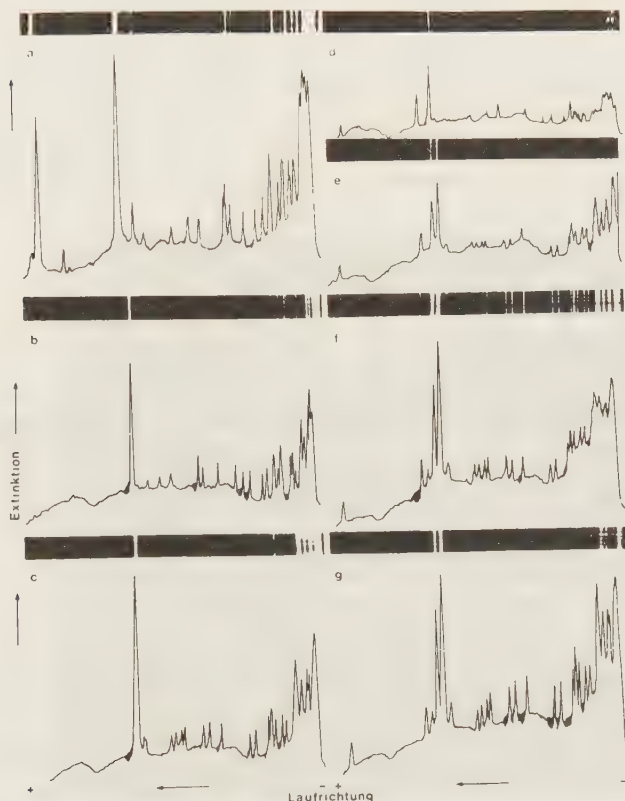


Abb.32: Densitometrische Auswertung von Negativen photographierter, Ethidiumbromid gefärbter 6,25% Acrylamidgele, in denen PstI-Fragmente von Rekombinanten und Elternstämmen aufgetrennt wurden. (a) Stamm No.11, (b) Stamm OMI, (c) Stamm S 295 C, (d) RK 48, (e) RK 191, (f) RK 191 II, (g) RK 191 III.

weist eine weniger übersichtliche H-DNA-Struktur auf. RK 191 entstand aus Stamm OMI-DNA gespalten mit BamHI, Stamm No.11-DNA gespalten mit XhoI und Stamm S 295 C-DNA gespalten mit KpnI. Die L-DNA zeigt für alle verwendeten Enzyme der Gruppe II (und der Gruppe I soweit dies nach der Auftrennung der Fragmente im Gel sichtbar ist) das gleiche Spaltmuster wie Stamm S 295 C (Abb. 16). Die Spaltungen von H- und M-Genomen mit den Enzymen HpaII und PstI ergaben aber, daß die H-DNA von RK 191 repetitive Einheiten von allen drei Elternstämmen erhalten hat (Abb. 33). Die oben ausgeführte Auswertemethode ergab, daß Stamm S 295 C H-DNA-Sequenzen zu etwa 50%, Stamm OMI H-DNA-Sequenzen zu etwa 38% und Stamm No.11 H-DNA-

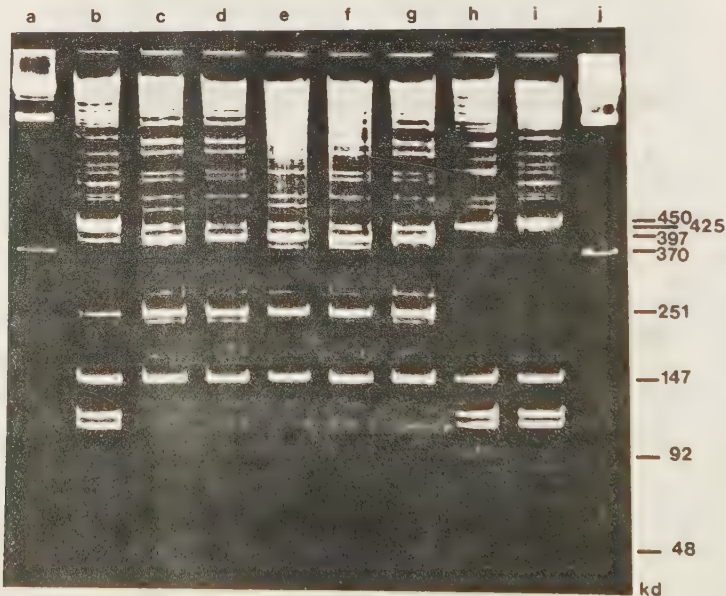


Abb.33: Vergleichende Spaltungen von M-DNA von Rekombinanten und Elternstämmen mit PstI und Auftrennung der Fragmente in einem 6,25% Polyarylamidgel. (a+j) Lambda x HindIII, (b) RK 191, (c) RK21, (d) RK 29, (e) RK 42, (f) RK 50, (g) Stamm No.11, (h) Stamm OMI, (i) Stamm S 295 C.

Sequenzen zu etwa 12% in der H-DNA von RK 191 vertreten sind (Abb. 32). Die Spaltung von RK 191-DNA mit SmaI ergibt eine zusätzliche Bande von 520 kd Größe, die keine DNA der Elternstämme aufweist. Sie tritt neben den SmaI-Banden der Elternstämme auf und entspricht in der Größe der Summe der Stamm OMI bzw. Stamm No.11 A+C+D-Fragmente (Abb. 34).

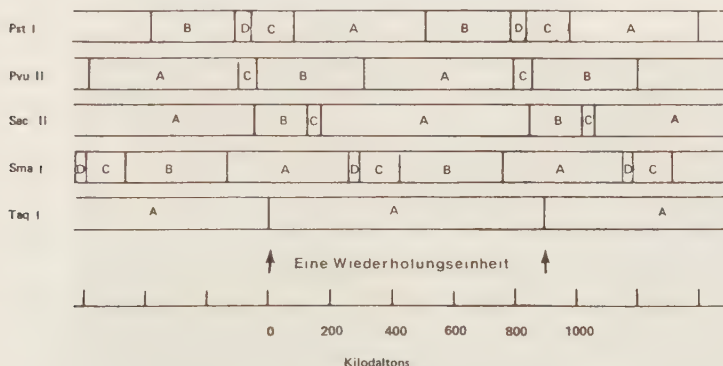


Abb.34: Physikalische Karten der H-DNA Wiederholungseinheit von *H. saimiri* Stamm No.11 (Fleckenstein and Mulder, 1980).

Es gibt keinen Hinweis auf eine Modifikation, d.h. Methylierung der H-DNA von RK 191 (Abb. 35). Die Spaltung der DNA mit TaqI, das nur einmal pro Wiederholungseinheit schneidet (Abb. 34) ergab, daß sich die Gesamtgröße einer Repetition nicht geändert hat (Abb. 35). Die relativ geringe Intensität des SmaI C-Fragmentes von RK 191 H-DNA in Abbildung 35 h, das dem SmaI A-Fragment vom Stamm OMI und Stamm No.11 entspricht, ist ein deutlicher Hinweis dafür, daß das SmaI A-Fragment der H-DNA von RK 191 auf einen Verlust von SmaI-Spaltstellen in der H-DNA vom Stamm OMI zurückzuführen ist. Die prozentualen Anteile der H-DNAs der Elternstämme an der H-DNA von RK 191 bzw. RK 48 blieben auch nach weiterem Passagieren und nach

Transfektionen stabil. So wurde bei RK 191 eine weitere Plaque-reinigungsstufe (RK 191 II) analysiert, mit dieser DNA transfiziert (RK 191 III) und mit dieser DNA nochmals transfiziert (RK 191 IV). Mit RK 48 wurde einmal transfiziert. Die DNAs der daraus erhaltenen Viruspartikel ließen sich von den jeweiligen Originalisolaten nicht

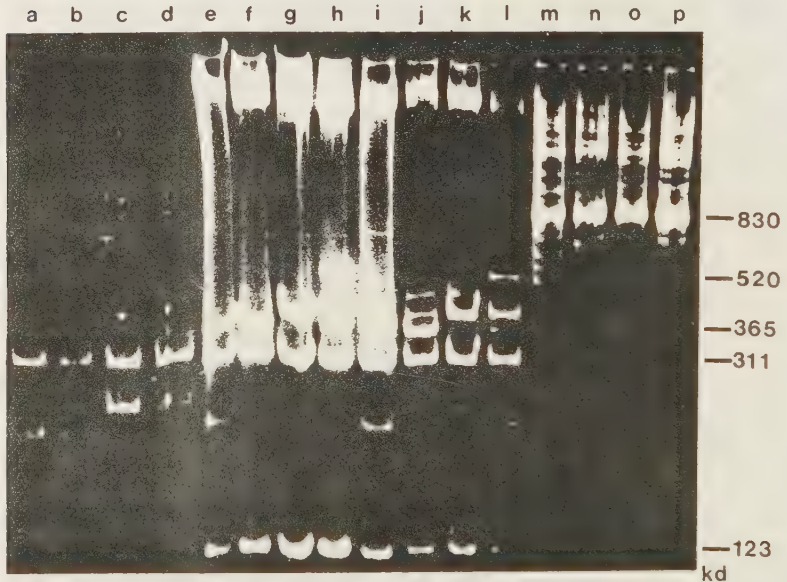


Abb.35: Vergleichende Spaltung von RK 191 und den Elternstämmen und Auftrennung der Fragmente im 6,2% PAGE.

(a) Stamm No.11 x TaqI x SmaI, (b) Stamm OMI x TaqI x SmaI, (c) Stamm S 295 C x TaqI x SmaI, (d) RK 191 x TaqI x SmaI, (e) Stamm No.11 x SmaI, (f) Stamm OMI x SmaI, (g) Stamm S 295 C x SmaI, (h) RK 191 x SmaI, (i) Stamm No.11 x XmaI, (j) Stamm OMI x XmaI, (k) Stamm S 295 C x XmaI, (l) RK 191 x XmaI, (m) Stamm No.11 x TaqI, (n) Stamm OMI x TaqI, (o) Stamm S 295 C x TaqI, (p) RK 191 x TaqI.

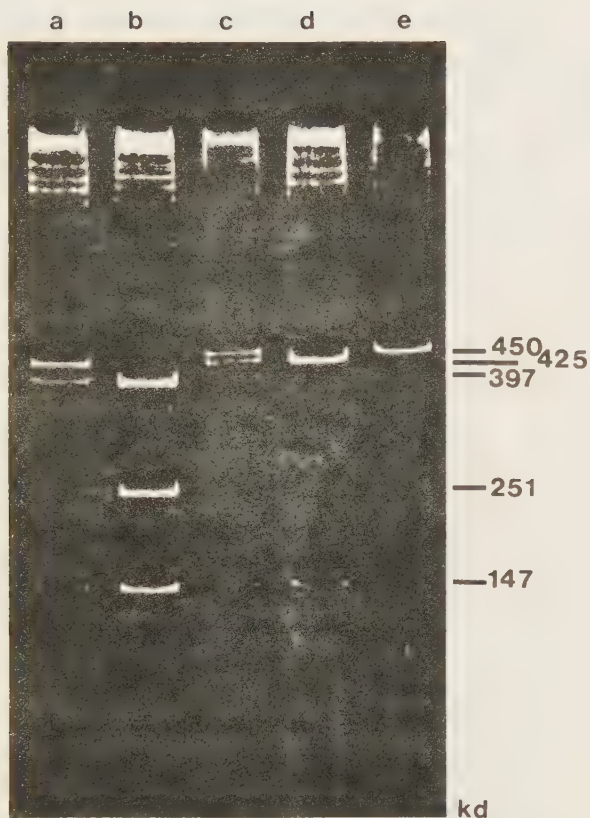


Abb.36: Vergleichende Spaltungen der M-DNA von RK 191 und RK 48 nach mehreren Passagen und der Elternstämme mit PstI und Auftrennung der Fragmente in einem 6,25% Polyacrylamidgel. (a) RK 48 II, (b) Stamm No.11, (c) RK 191 IV, (d) Stamm OMI, (e) Stamm S 295 C.

unterscheiden. Die prozentualen Anteile der verschiedenen H-DNA-Sequenzen blieben unverändert (Abb. 36). Dies besagt, daß auffallenderweise innerhalb eines M-Genoms verschiedene H-DNA-Sequenzen über mehrere Passagen bzw. Replikationszyklen in Zellkultur erhalten bleiben können.

5. Rekombinanten zwischen H. saimiri, H. ateles und H. aotus Typ II

Auf Grund der partiellen Homologien zwischen H. saimiri und H. ateles

zur Rekombination angebotene Fragmente	Anzahl der Versuche	Beobachtungszeit (a) (Tage)
Stamm 11 xBamHI + H.ateles xSall	8	>90
RF 8 xSall + H.ateles xSall	8	>90
S 295 C xSacII + H.ateles xSall	8	>90
Stamm 11 xSall + H.ateles xBamHI	5	>90
RK 241 xSall + H.ateles xBamHI	5	>90
RF 8 xSall + H.ateles xBamHI	(b) 5	>90
Stamm 11 xSall + H.aotus TypIIxBamHI	5	>90
RK 241 xSall + H.aotus TypIIxBamHI	5	>90
RF 8 xSall + H.aotus TypIIxBamHI	5(b)	>90
Stamm 11 xSall + λ xBamHI	3	>90
RK 241 xSall + λ xBamHI	3	>90
RF 8 xSall + λ xBamHI	3	>90

(a) Zeitdauer von der Transfektion bis zur Degeneration des Zellrasens

(b) insgesamt 3 Isolate, die sich aber als RF 8 erwiesen

Tab. 8: Versuche, Rekombinanten zwischen H. saimiri und H. ateles 73 bzw. H. aotus Typ II sowie mit dem Phagen Lambda zu erhalten.

sowie zwischen H. saimiri und H. aotus Typ II wurde in zahlreichen Ansätzen versucht, Rekombinanten zwischen diesen Viren zu konstruieren (Tab. 8). In mehr als 50 Transfektionsversuchen war es in keinem Fall möglich, eine Rekombinante zu erhalten. Dies kann bedeuten, daß "crossing-over"-Phänomene in OMK-Zellkultur nur bei einem hohen Grad von Homologie so wahrscheinlich bleiben, daß ein Kotransfektionsversuch Erfolg hat. Es könnte aber auch bedeuten, daß die Anordnung essentieller Gene in den verschiedenen Virusstämmen so unterschiedlich ist, daß die Bildung einer Rekombinanten mit allen für die Replikation notwendigen Genen ein unwahrscheinliches Ereignis wird. Als dritte Möglichkeit wäre denkbar, daß H. saimiri und H. ateles bzw. H. aotus Typ II in der Feinstruktur der viralen Strukturproteine solche Unterschiede aufweisen, daß keine gemischten Viruspartikel gebildet werden können.

III. Vergleich der Strukturproteine der Rekombinanten mit den Wildtyp-Stämmen

Wie in I./Abschnitt 2 dargestellt, unterscheiden sich die Molekulargewichte der Strukturproteine der wt-Virusstämme im wesentlichen nur bei vier Proteinen. Drei dieser Proteine sind Phosphoproteine, lediglich bei P 17 ist keine Modifikation nachweisbar (Abb. 8, Tab. 4). In einer Serie von Experimenten wurde versucht, weitere Strukturproteine zu differenzieren. Es wurde versucht, Proteine mit den Enzymen Staphylokokkus V 8-Protease, Thermolysin, Subtilisin, Chymotrypsin und Elastase spezifisch zu degradieren und an Hand charak-

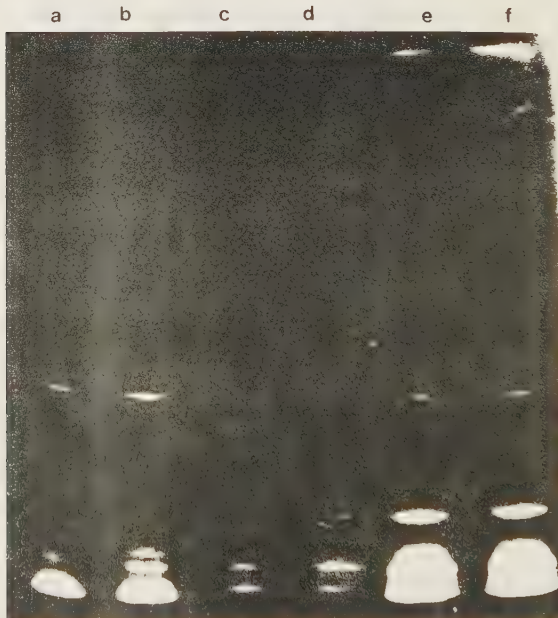


Abb. 37 A

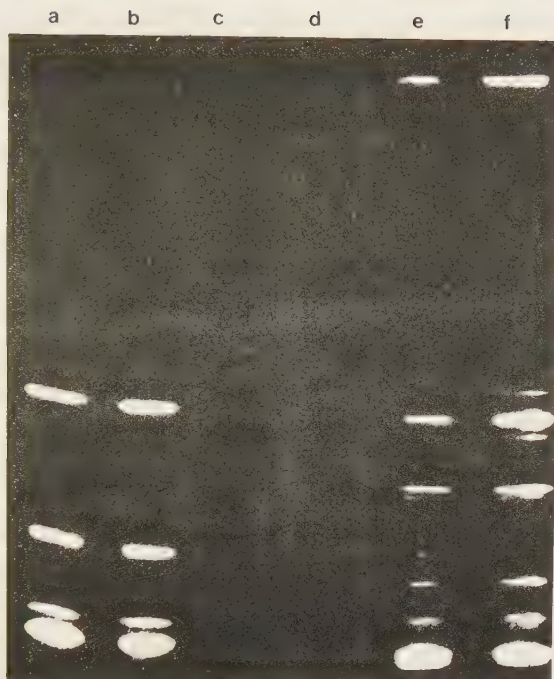


Abb. 37B

Abb. 37: Vergleich der proteolytischen Peptide der Proteine P2 und P3 der Virusstämme No.11, S 295 C und RF 6.

(A) Verdau mit 5 ug Chymotrypsin. (a) P3 von No.11, (b) P3 von S 295 C, (c) P2 von RF 6, (d) P2 von RF 6, und 10 ug Chymotrypsin, (e) P2 von No.11, (f) P2 von S 295 C.

(B) Verdau mit 1 ug Staphylokokkus V8-Protease.

(a) P3 von No.11, (b) P3 von S 295 C, (c) P2 von RF 6, (d) P2 von RF6 mit 2,5 ug Enzym, (e) P2 von No.11, (f) P2 von S 295 C.

teristischer Spaltmuster zu differenzieren. Als Separationsmethode diente das von Cleveland et al., (1978) beschriebene Gelsystem. In einer kollaborativen Studie mit Gary Cohen, University of Pennsylvania, wurde versucht, tryptische Fragmente isolierter Proteine mit Hilfe ihres Elutionsprofils aus einer Kationenaustauscher-Säule zu unterscheiden (Cohen et al., 1980). Bei allen Experimenten dieser Art zeigte sich, daß bei den untersuchten Proteinen eine Differenzierung zwischen den Stämmen nicht möglich ist, da die jeweiligen Peptidmuster identisch waren (Abb. 37).

Soweit die Strukturproteine zwischen den Stämmen durch unterschied-

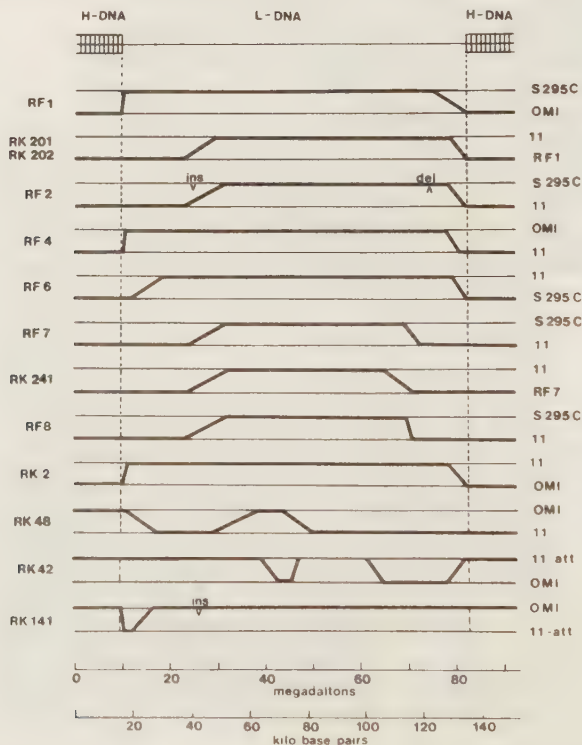


Abb.38: Schematische Darstellung der *H. saimiri* Rekombinanten. Die DNA-Sequenzen der Elternstämme sind durch eine dicke Linie gekennzeichnet.

liche Molekulargewichte differenziert werden konnten, wurden die codierenden Sequenzen auf dem Genom mit Hilfe der Rekombinanten (Abb. 38) bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß alle Rekombinanten, außer RF 8 und RK 201/202, immer einen vollständigen Satz der phosphorylierten Strukturproteine mit unterscheidbarem MW von einem Elternstamm geerbt hatten (Abb. 39). RF 8 und RK 201/202 besitzen

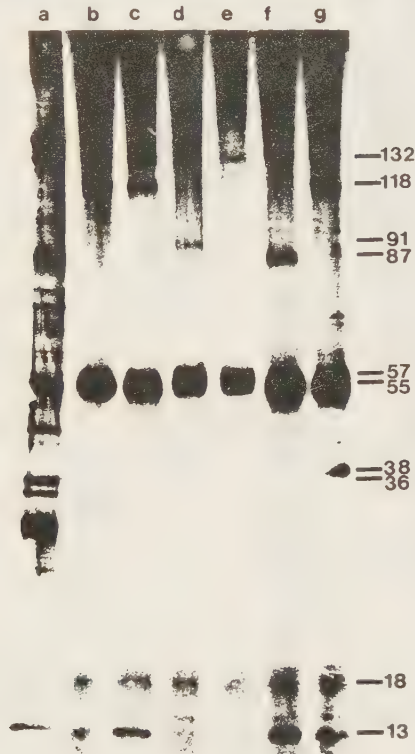


Abb.39: Auftrennung von ^{32}P -Orthophosphat markierten Strukturproteinen gereinigter Viruspartikel im 7,5-20% SDS-Gradienten-PAGE nach anschließender Autoradiographie. (a) Stamm OMI (^{35}S -Methionin-markiert), (b) RK 48, (c) RF 42, (d) RF 2, (e) Stamm S 295 C, (f) Stamm OMI, (g) Stamm No.11. Die vor allem in (g) sichtbaren zusätzlichen Banden sind T₇-Strukturproteine, die als interne MW-Marker dienten.

ein Phosphoprotein mit einem MW von 93 kd bzw. 127 kd, das damit etwas größer ist als das P 5 von Stamm S 295 C bzw. Stamm No.11, einem der Elternstämme (Abb. 40) und deutlich verschieden ist vom P 5 des anderen Elternstammes. Die Rekombinanten RK 201/202 haben zwar noch Stamm OMI-Sequenzen in der L-DNA, aber in Regionen wo P 5 nicht codiert. RK 201/202 gehören neben RK 42 zu den rekombinanten

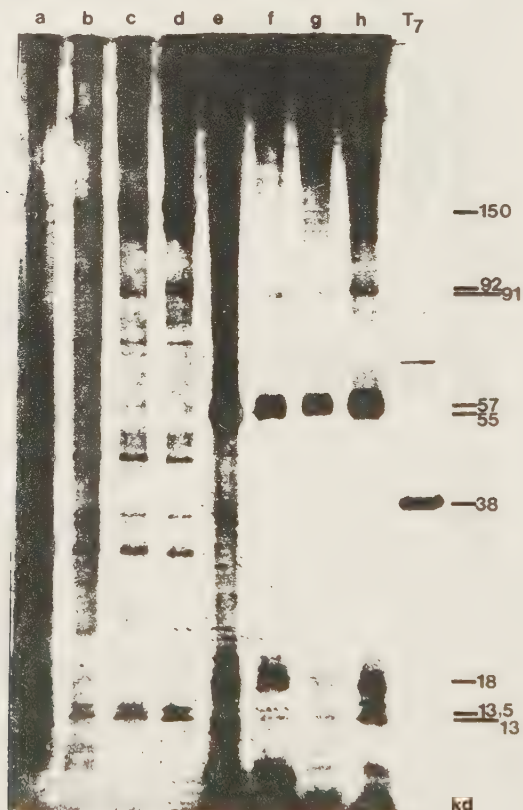


Abb. 40: Vergleichende Auftrennung von ³⁵S-Methionin (a-d) und ³²P-Orthophosphat (e-h) markierten Strukturproteinen gereinigter Viruspartikel im 7,5-20% SDS-Gradienten-PAGE nach anschließender Autoradiographie. (a+e) Stamm No.11, (b+f) Stamm S 295 C, (c+g) RF 7, (d+h) RF 8.

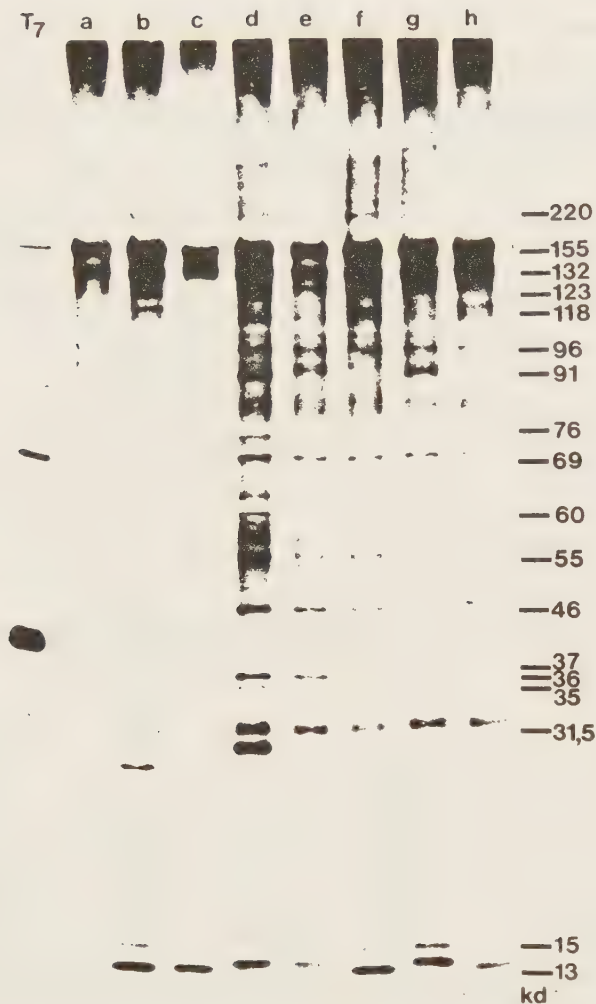


Abb.41: Auftrennung ^{35}S -Methionin markierter Strukturproteine partiell gereinigter Viruspartikel von Rekombinanten und Elternstämmen im 7,5-20% SDS-Gradientengel.
 (a) Stamm S295 C, (b) RK 42, (c) Stamm No.11, (d) RF 7, (e) RF 8, (f) RK 50, (g) RF 2, (h) Stamm 11-att.

Virusstämmen, in denen ein weiterer Proteinaustausch zu beobachten ist. Hierbei handelt es sich um P 17, das bei RK 201/202 wie P 17 von Stamm S 295 C im Gel läuft, während P 14 und P 24 entsprechend den Proteinen von Stamm No.11 laufen.

Bei RK 42 haben P 5, P 14 und P 24 die gleichen MW wie die von Stamm 11-att. Lediglich P 17 läuft wie das entsprechende Protein von Stamm OMI, dem zweiten Elternvirusstamm (Abb. 41). Eine zusammenfassende Darstellung dieser Ergebnisse zeigt Abbildung 42.

Eine weitere Besonderheit bei den Strukturproteinen weist die Rekombinante RF 6 auf. Ihr fehlt nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese sowohl in der Coomassieblau-Färbung (Abb. 43) als auch in der Fluorographie ^{35}S -Methionin markierter Strukturproteine das Protein P 3 (Abb. 44). Dieses Protein gehört zu den im H. saimiri am häufigsten vorkommenden Nucleocapsidproteinen. Es ist kein anderes

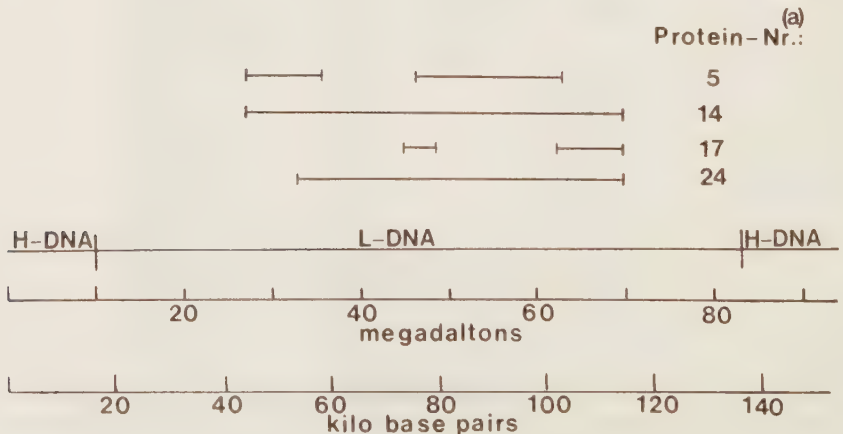


Abb.42: Schematische Darstellung der Genomabschnitte, die für diejenigen Strukturproteine codieren, die auf Grund ihrer Molekulargewichtsunterschiede differenzierbar sind.

oder neues Protein in dieser Rekombinante nachweisbar, das P 3 ersetzen könnte. Die elektronenmikroskopische Untersuchung gereinigter Viruspartikel und Nucleocapside ließ keinen Unterschied zu den wt-Virusstämmen erkennen. Das Wachstum der Viren in Zellkultur war nicht deutlich von dem der Elternstämme oder anderer Rekombinanten zu unterscheiden. Das Protein P 3 wurde auch nicht von Protein P 2 überdeckt, was durch Vergleich der Peptide von V 8-Protease- und Chymotrypsinverdau von P 2 und P 3 der Elternstämme mit P 2 und RF 6 sehr deutlich zu zeigen war (Abb. 37).

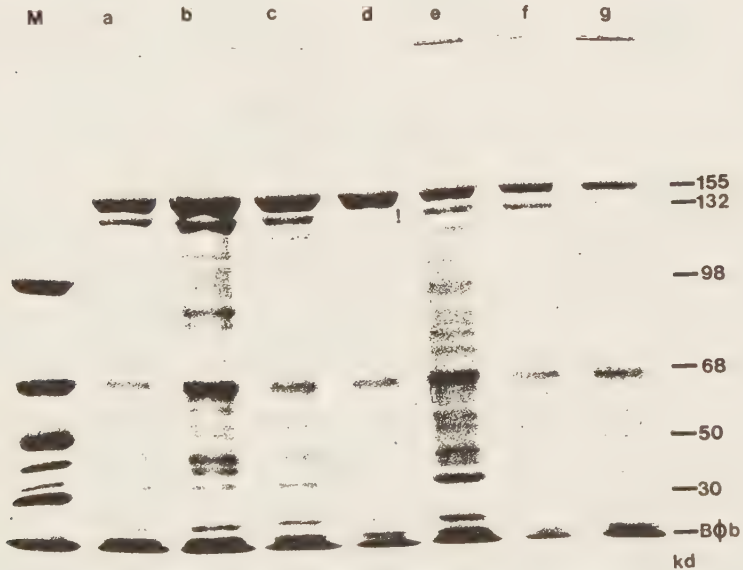


Abb.43: Coomassieblau-Färbung eines 7,5% SDS-PAGE in dem ³⁵S-Methionin markierte Strukturproteine gereinigter Viruspartikel aufgetrennt wurden und aus dem Banden für proteolytische Verdau ausgeschnitten wurden. (a) Stamm OMI, (b) Stamm OMI, (c) Stamm No.11, (d) RF 6, (e)Stamm No.11, (f) Stamm S 295 C, (g) Stamm S 295 C, (M) Molekulargewichtsmarker.



Abb.44: Auftrennung von ^{35}S -Methionin markierten Strukturproteinen gereinigter Viruspartikel von Rekombinanten und Elternstämmen im 7,5-20% SDS-Gradientengel.
(a) Stamm No.11, (b) RF 1, (c) RF 2, (d) Stamm OMI, (e) RF 4, (f) RF 6, (g) RK 201, (h) Stamm S 295 C.

E. Diskussion

Die Untersuchung von Rekombinanten zwischen unterschiedlichen Stämmen von Viren erwies sich in vielen Systemen als ein wesentliches Glied der funktionellen Analyse viraler Genexpression. Dies gilt sowohl für Bakteriophagen (Beier et al., 1977) als auch für animale Viren (Mautner et al., 1975; Williams et al., 1975).

Timbury and Subak-Sharpe (1973) isolierten mit Hilfe von ts-Mutanten erstmals intertypische Rekombinanten zwischen Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) und Herpes-simplex-Virus Typ 2 (HSV-2). In der Folge wurden eine Reihe weiterer Methoden entwickelt, um Rekombinanten zwischen diesen beiden Virusstämmen zu selektionieren. (Übersicht von Halliburton, 1980). Allen diesen Methoden ist gemeinsam, daß sie auf Selektionssysteme angewiesen sind, die von zumindest einem Elternstamm eine genetische Änderung gegenüber dem wt-Virus verlangen (z.B.: Temperaturempfindlichkeit oder Resistenz der virus-codierten DNA-Polymerase gegen Phosphonoacetat). Ein wesentliches Problem ist, daß Revertanten und/oder komplementierbare Marker zunächst falsch positive Ergebnisse vortäuschen können.

Im Gegensatz zu diesen Versuchen wird in der vorliegenden Arbeit eine Methode beschrieben, Rekombinanten zwischen verschiedenen Stämmen eines Herpesvirus zu konstruieren, die ohne biologisches Selektionssystem durchführbar ist. Diese Methode baut auf der besonderen Genomstruktur des hochonkogenen Virus sowie auf der Verfügbarkeit sehr infrequent schneidender Restriktionsendonucleasen auf. Diese Methode der Isolation von Rekombinanten ist vergleichsweise sehr effizient. Eine alternative Methode kommt derzeit bei onkogenen Primaten-Herpesviren nicht in Betracht, da konditional-letale Mutanten nicht vorhanden sind.

Mit Hilfe der Rekombinanten zwischen verschiedenen H. saimiri-Stämmen wurden weitere Hinweise auf molekulare Eigenschaften des Virus erhalten. Der Vergleich der Strukturproteine der Rekombinanten mit denen der Elternstämme ergab erste Hinweise über die Zuordnung von Strukturproteinen und codierender Genomsequenz. Im Rahmen dieser Versuche wurden erstmals die Strukturproteine eines lymphotropen Herpesvirus vergleichend untersucht und in Bezug auf ihre Molekulargewichte und Modifikationen (Phosphorylierung und Glycosylierung) beschrieben. Dies ergab, daß Viruspartikel etwa 25 bis 30 Proteine enthalten; fünf dieser Proteine sind phosphoryliert und sieben wurden als Glycoproteine identifiziert. Von den Strukturproteinen waren acht der Hülle zuzuordnen, wobei die angewandte Methodik nicht ausschließen kann, daß noch weitere Proteine in der Hülle lokalisiert sein könnten. Das Muster der Strukturproteine unterscheidet sich grundlegend von dem anderer Herpesviren, soweit sie beschrieben wurden. Dies gilt insbesondere für Herpes-simplex-Virus und das menschliche Cytomegalo-Virus. Soweit von anderen Arbeitsgruppen Ergebnisse vorliegen (Randell and Honess, 1981; Bodemer et al., pers. Mitteilung; Modrow und Wolf, pers. Mitteilung), sind sie mit den hier beschriebenen Ergebnissen voll kompatibel. An Hand dieser Studie zeigte sich, daß zwischen den verschiedenen Virusstämmen insgesamt vier Strukturproteine auf Grund ihres unterschiedlichen Molekulargewichts in der SDS-PAGE differenziert werden können. Drei von diesen (P 5, P 14 und P 24) sind phosphoryliert und dem Nucleocapsid zuzuordnen. Die Analyse der Rekombinanten im Hinblick auf diese Proteine ergab, daß die unterscheidbaren Phosphoproteine immer als Einheit von dem Elternstamm auf die Rekombinante weitergegeben wurden, von dem der innere Teil der L-DNA stammt. Ein Überblick über die Rekombinationswahrscheinlichkeit zwischen

unterschiedlichen wt-Virusstämmen mit Hilfe von acht verschiedenen Restriktionsendonucleasen macht deutlich, daß Überkreuzungen vorwiegend in den äußeren Bereichen der L-DNA vorkamen. Nur in Ausnahmen war ein kurzer Segmentaustausch in der Mitte der L-DNA möglich. Dies könnte bedeuten, daß jeweils ein Block von Genen aus dem Inneren der L-Region, welcher für Strukturproteine codiert, bei Rekombinationsvorgängen als Ganzes von einem der Elternstämme auf die Rekombinante übertragen werden muß. Dieser Befund erinnert an Analysen mit HSV, welches ebenfalls Regionen enthält, in denen Rekombinationen nicht oder nur selten möglich sind (Morse et al., 1978; Halliburton, 1980).

Im Rahmen dieser Arbeit hat sich auch gezeigt, daß die Entstehung von Rekombinanten zwischen *H. saimiri* und *H. ateles* mit dieser Methode trotz Basensequenzhomologien und ähnlicher Struktur des Genoms unwahrscheinlich ist. Dies mag auf unterschiedliche Anordnung entsprechender codierender Sequenzen, räumliche Inkompatibilität der Strukturproteine oder für Rekombinationsergebnisse unzureichende Sequenzhomologien zurückzuführen sein. Dies erinnert daran, daß es bisher auch nicht gelang, Rekombinanten zwischen HSV und Pseudorabiesvirus und zwischen HSV und Rinder-Mammilitis-Virus zu erhalten (Halliburton et al., 1977; Halliburton, 1980).

Bei der Analyse der DNA und der Proteine der Rekombinanten wurden einige Besonderheiten festgestellt. So haben die Isolate RF 2 und RK 141 eine Insertion von jeweils 2,1 md in der Nähe des linken Endes an der gleichen Stelle, soweit dies mit den zur Verfügung stehenden Methoden feststellbar ist. Beide Rekombinanten weisen auch eine Deletion auf. Diese liegt bei RF 2 in der Nähe des rechten Endes der L-DNA und ist 1,5 md groß. Bei RK 141 ist sie am

linken Ende und betrifft etwa 1 md der L-DNA. Die Natur der inserierten und deletierten Sequenzen ist bisher noch nicht genau bestimmt. Sie könnten dadurch bedingt sein, daß die L-Region kurze, in Tandem orientierte Repetitionen aufweist, an denen Duplikationen bzw. Deletionen auftreten können. Einen bemerkenswerten Befund bei der Untersuchung der Strukturproteine ergab die Rekombinante RF 6. Ihr fehlt eines der Hauptnucleocapsid-Proteine, nämlich das Phosphoprotein P 3. Diese Rekombinante ist im Elektronenmikroskop nicht von anderen *H. saimiri*-Stämmen zu unterscheiden, ihre DNA ergibt nach Transfektion infektiöses Virus und das Wachstum in Zellkultur ist nicht signifikant vom Wachstum der anderen Rekombinanten zu unterscheiden. Es könnte sich demnach bei P 3 um ein Protein handeln, dessen Funktion von einem Protein der infizierten OMK-Zelle übernommen wird und das in Viurspartikeln nicht vorkommen muß.

Der Replikationsmechanismus der Herpesviren ist im wesentlichen ungeklärt. Einer der möglichen Mechanismen wird durch das Modell des "Rolling circle" beschrieben. Für einzelne Vertreter sind Modelle entwickelt worden (Roizman, 1980; Vlazny and Frenkel, 1981), die aber nicht unumstritten sind (N. Wilkie, pers. Mitteilung). Ein Replikationsmodell für *H. saimiri* muß die Besonderheiten der M-DNA-Struktur sowie die Entstehung defekter Genome mit einbeziehen. So bilden sich H-Genome nach Transfektion gereinigter M-DNA bereits nach wenigen Replikationszyklen in der gleichen Konzentration wie in Virusstocks, die durch Infektion von Zellen mit intakten Viren erhalten werden (Fleckenstein et al., 1975). Dazu wären zwei Mechanismen denkbar. Einmal könnten mehrere Überkreuzungen an terminalen H-Sequenzen dazu führen, daß sich überlange H-Enden bilden, die beim Einfädeln in den Innenkörper des Kapsids abgeschnitten werden

und anschließend selber verpackt würden. Als zweite Möglichkeit wäre vorstellbar, daß sich während der DNA-Replikation H-DNA ringförmig abschnürt und aus solchen "Rolling circles" lange H-DNA-Ketten gebildet werden, die anschließend in Nucleocapside verpackt würden (Fleckenstein et al., 1975). Im Hinblick auf den Replikationsmechanismus von *H. saimiri* wurden Rekombinanten analysiert, die zwei (RK 48) oder drei (RK 191) verschiedene H-DNA-Sequenzen in den endständigen H-DNA-Bereichen aufweisen. Die Stabilität der relativen Anteile der H-DNA-Sequenzen nach Plaquereinigungen und Transfektionen in H- und M-Genomen dieser Rekombinanten läßt es gerechtfertigt erscheinen, folgendes, erweitertes Modell vorzuschlagen:

H. saimiri-DNA wird in der Zelle an den Enden zirkularisiert und als "Rolling circle" repliziert. M-Genome werden dann mit Hilfe eines Schneidemechanismus, der H-DNA-Sequenzen, die einen definierten physikalischen Abstand voneinander haben, erkennt und spaltet, in Einheitsgröße geschnitten und verpackt. Mit einer gewissen Häufigkeit könnten sich aus einem solchen "Rolling circle" H-DNA-Ringe abschnüren und sich lange H-DNA-Ringe bilden, die von dem Schneidemechanismus erkannt, gespalten und als defekte Genome encapsidiert werden. Dieses Modell steht in Einklang mit allen bisher bekannten Ergebnissen.

Die atemberaubende Entwicklung der Molekularbiologie während der vergangenen, wenigen Jahre wurde entscheidend von der Entwicklung der Gentechnologie, insbesondere der molekularen Klonierungsmethoden, bestimmt. Prokaryonte Klonierungsvektoren dienen der Amplifikation und Strukturuntersuchung isolierter eukaryonter Gene sowie der Produktion ihrer Genprodukte *in vitro*. In zunehmendem Maße

wurden in den letzten Jahren und Monaten eukaryonte Klonierungsvektoren entwickelt. Der erste beschriebene eukaryonte Klonierungsvektor war SV 40, mit dessen Hilfe es gelang, definierte Nucleinsäuresequenzen in Zellen zu inserieren (Mulligan et al., 1979; Hamer et al., 1979; Gruss et al., 1981). Die Grenzen dieses Klonierungssystems liegen darin, daß die Größe der Fremd-DNA strikt limitiert ist. Ein weiteres Vektorsystem konnte mit Hilfe der transformierenden Region des Rinderpapillom-Virus entwickelt werden (Sarver et al., 1981). Noch im Diskussionsstadium ist die Möglichkeit, die sogenannte "Unusual Symmetric Recombinant (SYREC)" zwischen Adenovirus Typ 12-DNA und DNA aus menschlichen KB-Zellen auf ihre Eignung als Klonierungsvektor zu untersuchen (R. Deuring, pers. Mitteilung).

Die hier vorgestellten Versuche haben gezeigt, daß auch H. saimiri zu einem eukaryonten Klonierungsvektor entwickelt werden könnte. Die zuletzt beschriebenen H. saimiri-Rekombinanten haben jeweils eine singuläre SaII-Spaltstelle. Falls diese Spaltstelle nicht innerhalb eines essentiellen Gens liegt, müßte es möglich sein, lange Fremdsequenzen in eine dieser SaII-Spaltstellen ohne Verlust an genetischer Information zu inserieren. Der Vorteil eines derartigen Systems wäre, daß man die fremden DNA-Sequenzen im lytischen System, im persistierenden Zustand im natürlichen Wirt, in induzierten Tumoren und mit Hilfe des attenuierten Vektors persistent im nicht natürlichen Wirt untersuchen könnte.

Wie bereits dargestellt, ist eine Deletion von ca. 1,1 md in der Nähe oder am linken Ende der L-DNA der einzige nachweisbare genomische Unterschied zwischen Stamm 11-att und seinem onkogenen Ausgangsstamm No.11. Um die Frage nach der Funktion der deletierten

Sequenz und deren Rolle bei der Tumorentstehung untersuchen zu können, wurden Rekombinanten aus Stamm 11-att und wt-Virusstämmen isoliert, welche die Deletion erhalten haben. Bei den Strukturproteinen lassen sich zwischen Stamm No.11 und Stamm 11-att mit den angewandten Techniken keinerlei Unterschiede nachweisen. Die Frage nach der Onkogenität der Rekombinanten RK 42 und RK 141 ist gegenwärtig noch offen, da die entsprechenden Tierversuche von L. Falk im Primatenzentrum der Harvard Medical School erst kürzlich initiiert wurden.

Bis heute konnte kein in vitro Transformationssystem für *H. saimiri* etabliert werden, wie dies zum Beispiel für Adenoviren der Fall ist. Deshalb bietet die Konstruktion von Rekombinanten zwischen onkogenen *H. saimiri*-Stämmen und attenuierten Stämmen die einzige und zugleich einzigartige Möglichkeit, etwas über jene Regionen von *H. saimiri* zu erfahren, welche für die Tumorentstehung verantwortlich sind.

F. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden entwickelt, um Rekombinanten zwischen verschiedenen Stämmen des hochonkogenen Herpesvirus saimiri (H. saimiri) zu konstruieren und zur funktionalen Charakterisierung des Virus einzusetzen.

H. saimiri-Partikel besitzen 24 identifizierbare Strukturproteine. Von diesen sind fünf phosphoryliert und sieben glycosyliert. Acht dieser Strukturproteine lassen sich dem Hüllmaterial des Virus zuordnen. Beim Vergleich von drei Wildtyp-Stämmen des H. saimiri ergab sich, daß die Mehrzahl der Strukturproteine dieser Stämme ein identisches Wanderungsverhalten in Polyacrylamidgelen aufweisen, während sich vier Proteine an Hand verschiedener Molekulargewichte voneinander unterscheiden lassen.

Die ungewöhnliche Genomstruktur von H. saimiri ermöglichte es, durch Transfektion langer überlappender Restriktionsfragmente Rekombinanten zwischen verschiedenen Virusstämmen zu konstruieren, ohne auf ein biologisches Selektionssystem angewiesen zu sein. Fünfzehn der isolierten Rekombinanten wurden mit einer Anzahl niedrig spaltender Restriktionsendonucleasen vergleichend kartiert. Durch Analyse der Strukturproteine der Rekombinanten konnten erste Hinweise auf die Lokalisation Protein-codierender Genomabschnitte gewonnen werden.

Zwei der Rekombinanten weisen in ihrem gesamten Genom nur mehr eine SalI-Spaltstelle auf; diese Virusstämmen könnten als eukaryote Klonierungsvektoren betrachtet werden.

Die Rekombinanten, die ihre H-DNA von verschiedenen Elterstämmen erhalten haben ergaben weitere Hinweise auf den Replikationsmechanismus von H. saimiri. Die Stabilität der relativen Anteile der ver-

schiedenen H-DNAs unterstützt, basierend auf einem Ligations-
schluß, das DNA-Replikationsmodell des "Rollenden Zirkels".

Rekombinanten zwischen dem attenuierten Virusstamm 11-att und
dem hochonkogenen Virusstamm OMI wurden konstruiert, um funktio-
nelle Hinweise auf die onkogene Region des H. saimiri-Genoms zu
finden. In diesen Rekombinanten ist die L-DNA-Deletion von Stamm
11-att erhalten. Die Prüfung dieser Rekombinanten auf attenuierten
Phänotyp wurde in Zusammenarbeit mit L. Falk am Primatenzentrum
von Harvard Medical School initiiert.

G. Literaturverzeichnis

- Anker, H.S. 1970.
A solubilizable acrylamide gel for electrophoresis.
FEBS Letters 7
- Beier, H., Golomb, M., and Chamberlain, M. 1977.
Isolation of recombinants between T₇ and T₃ bacteriophages and
their use in vitro transcriptional mapping.
J. Virol. 21, 753-765
- Böhm, J., Keil, G., and Knippers, R. 1977.
Studies on protein-phosphorylation reactions in isolated chromatin.
Eur. J. Biochem. 78, 251-266
- Bonner, W.M., and Laskey, R.A. 1974.
A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic
acids in polyacrylamide gels.
Eur. J. Biochem. 46, 83-88
- Bornkamm, G.W., Delius, H., Fleckenstein, B., Werner, F.-J., and
Mulder, C. 1976.
The structure of herpesvirus saimiri genomes: arrangement of heavy
and light sequences within the M genome.
J. Virol. 19, 154-161
- Brown, A., and Officer, J.E. 1968.
Contamination of cell cultures by mycoplasma (PPLO).
in Methods in Virology, Vol. 4
Maramorosch, K., and Koprowski, H., eds.
Academic Press, New York and London
- Burridge, K. 1978.
Direct identification of specific glycoproteins and antigens in
sodium dodecyl sulfate gels.
in Methods in Enzymology 50, 54-64
Moldave, K., and Grossman, L., eds.
Academic Press, New York and London
- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W., and Laemmli, U.K.,
1977.
Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate
and analysis by gel electrophoresis.
J. Bio. Chem. 252, 1102-1106

- Cohen, G.H., Ponce de Leon, M., Diggelmann, H., Lawrence, W.C., Vernon, S.K., and Eisenberg, R.J. 1980.
Structural analysis of the casid polypeptides of Herpes simplex virus Types 1 and 2.
J. Virol. 34, 521-531
- Daniel, M.D., Silva, D., and Ma, N. 1976.
Establishment of owl monkey cell line 210 for virological studies.
in vitro 12, 290
- Daniel, M.D., Silva, D., Koomey, J.M., Mulder, C., Fleckenstein, B., Tamulevich, R., King, N.W., Hunt, R.D., Seghal, P., and Falk, L.A. 1979.
Herpesvirus saimiri: Strain SMHI modification of oncogenicity.
in Advances in Comparative Leukemia Research, 395-396
Yohn, D.S., Lapin, B.A., Blakeslee, J.R., eds.
Elsevier/North Holland, New York, Amsterdam, Oxford.
- Deinhardt, F., Marczyńska, B., Shramek, G., and Wolfe, L. 1973.
Herpesvirus saimiri: a simian counterpart of Epstein-Barr virus of man?
in Bibliotheca Haematologica, 416-427
Dutcher, R.M., and Chieco-Bianchi, L., eds.
Karger, Basel.
- Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. 1964.
Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma.
Lancet 2, 702
- Epstein, M.A., Achong, B.G., Churchill, A.E., and Biggs, P.M. 1968.
Structure and development of the herpes-type virus of Marek's disease.
J. Nat. Cancer Inst. 41(3), 805
- Epstein, M.A., Hunt, R.D. and Rabin, H. 1973.
Pilot experiments with EB-virus in owl monkeys. I Reticulo-proliferate disease in an inoculated animal.
Int. J. Cancer 12, 309-318
- Falk, L., Wolfe, L., and Deinhardt, F. 1972.
Epidemiology of Herpesvirus saimiri infection in squirrel monkeys.
in Medical Primatology III, 151-158
Goldsmith, E.I., Moor-Janowski, J., eds.
Karger, Basel.

- Falk, L.A., Jr. 1980.
Biology of Herpesvirus saimiri and Herpesvirus ateles.
in Viral Oncology
George Klein, ed.
Raven Press, New York.
- Fawcett, D.W. 1956.
Electron microscope observations of intracellular virus-like
particles associated with the cells of the Lucké renal adenocar-
cinoma.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 725
- Felsenfeld, G., and Hirschmann, S.Z. 1965.
A neighbour-interaction analysis of the hypochromism and spectra
of DNA.
J. Mol. Biol. 13, 407-427
- Fleckenstein, B. 1975.
Onkogenese durch Herpesvirus saimiri in Primaten - Molekularbio-
logische Modelluntersuchungen zur Herpesvirus-bedingten Tumorent-
stehung beim Menschen.
Habilitationsschrift dem Fachbereich Medizin der Friedrich-
Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
- Fleckenstein, B. 1979.
Oncogenic Herpesviruses of non-human primates.
Biochimica et Biophysica Acta, 560, 301-342
- Fleckenstein, B., and Wolf, H. 1974.
Purification and properties of H. saimiri DNA.
Virology 58, 55-64
- Fleckenstein, B., and Bornkamm, G.W. 1975.
Structure and function of H. saimiri DNA,
in: "Oncogenesis and Herpesviruses II", Part 1, 145-150
de Thé, G., zur Hausen, H., and Epstein, M.A., eds.
IARC Press, Lyon, France.
- Fleckenstein, B., and Mulder, C. 1980.
Molecular Biological Aspects of Herpesvirus saimiri and Herpes-
virus ateles.
in Viral Oncology, 799-812
George Klein, ed.
Raven Press, New York.

- Fleckenstein, B., and Desrosiers, R.C. 1981.
Herpesvirus saimiri and Herpesvirus ateles.
in: Comprehensive Virology
in press.
- Fleckenstein, B., Bornkamm, G.W., and Ludwig, H. 1975a.
Repetitive sequences in complete and defective genomes of Herpes-
virus saimiri.
J. Virology 15, 398
- Fleckenstein, B., Bornkamm, G.W., Mulder, C., Werner, F.-J.,
Daniel, M.D., Falk, L.A., and Delius, H. 1978.
Herpesvirus ateles DNA and Its Homology with Herpesvirus saimiri
Nucleid Acid.
J. of Virology 25, 361-373
- Garoff, H., and Simons, K. 1980.
Viral Envelope Proteins.
in Cell Membranes and Viral Envelopes 2
Blough, H.A., and Tiffany, J.M., eds.
Academic Press, London.
- Geelen, J.L.M.C., Walig, C., Wertheim, P., and van der Noordaa,
J. 1978.
Human Cytomegalovirus DNA. I. Molecular Weight and Infectivity.
J. of Virology 26, 813-816
- Grimes, W.J., Irwin, G.N., and Patt, L.M. 1980.
Glycosylation of Viral Envelope Components.
in Cell Membranes and Viral Envelopes 2
Blough, H.A., and Tiffany, J.M., eds.
Academic Press, London.
- Grodzicker, T., and Hopkins, N. 1980.
Origins of Contemporary DNA Tumor Virus Research.
in DNA TUMOR VIRUSES Molecular Biology of Tumor Viruses, Second
Edition, Part 2, 1-60
Cold Spring Harbor monographs; 10B.
- Gruss, P., and Khoury, G. 1981.
Expression of simian virus 40-rat preproinsulin recombinants in
monkey kidney cells: Use of preproinsulin RNA processing signals.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 133-137

- Halliburton, I.W. 1980.
Intertypic Recombinants of Herpes Simplex Viruses.
J. gen. Virol. 48, 1-23
- Halliburton, I.W., Randall, R.E., Killington, R.A. and
Watson, D.H. 1977.
Some properties of recombinants between type 1 and type 2
herpes simplex viruses.
Journal of General Virology 36, 471-484
- Hamer, D.H. and Leder, P. 1979.
Expression of the chromosomal mouse B meis-globin gene cloned
in SV40.
Nature 281, 35-40
- Henle, G., and Henle, W. 1966.
Immunofluorescence in cells derived from Burkitt lymphoma.
J. Bacteriol. 91, 1248-1256
- Hunt, R.D., Garcia, F.G., Barahona, H.H., King, N.W., Fraser,
C.E.O., and Melendez, L.V. 1973.
Spontaneous Herpesvirus saimiri lymphoma in an owl monkey.
J. Infect. Dis. 127, 723
- Keil, G., Müller, I., Fleckenstein, B., Koomey, J.M., and
Mulder, C. 1980.
Generation of Recombinants between Different Strains of
Herpesvirus Saimiri.
in Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation 7
- Klenk, H.-D. 1980.
Carbohydrates of Viral Envelopes.
in Cell Membranes and Viral Envelopes 2
Blough, H.A., Tiffany, J.M., eds.
Academic Press, London.
- Laemmli, U. 1970.
Cleavage of structural proteins during assembly of the head
of bacteriophage T4.
Nature 227, 680
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.
1951.
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265

- DeMarchi, J.M., Blankenship, M.L., Brown, G.D., and Kaplan, A.S. 1978.
Size and Complexity of Human Cytomegalovirus DNA.
Virology 89, 643-646
- Mautner, V., Williams, J., Sambrook, J., Sharp, P.A. and Grodzicker, T. 1975.
The location of the genes coding for hexon and fiber proteins in adenovirus DNA.
Cell 5, 93-99
- Medveczky, P. 1980.
Structural differences in the genomes of 14 strains of herpesvirus saimiri.
Cold Spring Harbor monographs
- Melendez, L.V., Daniel, M.D., Hunt, R.D., and Garcia, F.G. 1968.
An apparently new herpesvirus from primary kidney cultures of the squirrel monkey.
Lab. Anim. Care 18, 374-381
- Melendez, L.V., Hunt, R.D., Daniel, M.D., Garcia, F.G., and Fraser, C.E.O. 1969.
H. saimiri II. Experimentally induced malignant lymphoma in primates.
Lab. Anim. Care 19, 378-386
- Melendez, L.V., Hunt, R.D., King, N.W., et al. 1972.
H. ateles, a new lymphoma virus of monkeys.
Nature N. B. 235, 182-184
- Mizell, M., Stackpole, C.W., and Helperen, S. 1968.
Herpes-type virus recovery from "virus-free" frog kidney tumors.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 808
- Morse, L.S., Pereira, L., Roizman, B., and Schaffer, P.A. 1978.
Anatomy of Herpes Simplex Virus (HSV) DNA. Mapping of Viral Genes by Analysis of Polypeptides and Functions Specified by HSV-1 x HSV-2 Recombinants.
J. of Virology 26, 389-410
- Mulligan, R.C., Howard, H. and Berg, P. 1979.
Synthesis of rabbit 3-globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV 40 3-globin recombinant genome.
Nature 277, 108-114

- Nazerian, K., Solomon, J.J., Witter, R. and Burmester, B.R.
1968.
Studies on the etiology of Marek's disease. II. Finding of a
herpesvirus in cell culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 177
- Rafferty, K.A. 1964.
Kidney tumors of the leopard frog: A review.
Cancer Res. 24, 169
- Randall, R.E., and Honess, R.W. 1980.
Proteins of Herpesvirus Saimiri: Identification of Two Virus
Polypeptides Released into the Culture Medium of Productively
Infected Cells.
J. gen. Virol. 51, 445-449
- Roberts, R.J. 1978.
Restriction and Modification Enzymes and Their Recognition
Sequences.
Gene, 4, 183-193
- Roizman, B. 1979.
The Structure and Isomerization of Herpes Simplex Virus Genomes.
Cell. 16, 481-494
- Sarver, N., Gruss, P., Ming, F.-L., Khoury, G., and Howley, P.M.
1981.
Bovine Papilloma Virus DNA - A Novel Eukaryotic Cloning Vector.
Molecular and Cellular Biology (in press)
- Schaffer, P.A., Falk, L.A., and Deinhardt, F. 1975.
Attenuation of Herpesvirus saimiri for marmosets after successive
passage in cell culture at 39°C.
J. Natl. Cancer Inst. 55, 1243
- Sheldrick, P., Berthelot, N. 1979.
Inverted repetitions in the chromosome of Herpes-virus simplex.
Cold Spring Harbor-Symposium on quantitative biology 39, 667-678
- Shope, Th., Dechairo, D., and Miller, G. 1973.
Malignant Lymphoma in Cottontop Marmosets after Inoculation
with Epstein-Barr Virus.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 2487-2491

- Spear, P.G. 1980.
Herpesviruses.
in Cell Membranes and Viral Envelopes 2
Blough, H.A., and Tiffany, J.M., eds.
Academic Press, London.
- Sundar, S.K., Levine, P.H., Ablashi, D.V., Leiseca, S.A.,
Armstrong, G.R., Cicmanec, J.L., Parker, G.A., and Nonoyama, M.
1981.
- Epstein-Barr virus-induced malignant lymphoma in a white-lipped
marmoset.
Int. J. Cancer 27, 107-111
- Timbury, M.C., and Subak-Sharpe, J.H. 1973.
Genetic interactions between temperature-sensitive mutants of
types 1 and 2 herpes simplex viruses.
Journal of General Virology 18, 347-357
- Todaro, G.J., Sherr, Ch.J., Sen, A., King, N., Daniel, M.D.,
and Fleckenstein, B. 1978.
Endogenous New World primate type C viruses isolated from owl
monkey (*Aotus trivirgatus*) kidney cell line.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1004-1008
- Tooze, J. 1973.
Herpesviruses.
in The molecular biology of Tumoviruses 470-501
Tooze, J., ed.
- Tus sen, P., and Kurstak, E. 1979.
A Simple and Sensitive Method for the Purification and Peptide
Mapping of Proteins Solubilized from Densonucleosis Virus with
Sodium Dodecyl Sulfate.
Analytical Biochemistry 99, 97-104
- Vlazny, D.A., and Frenkel, N. 1981.
Replication of herpes simplex virus DNA: Localization of
replication recognition signals within defective virus genomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 742-746
- Williams, J., Grodzicker, T., Sharp, P. and Sambrook, J. 1975.
Adenovirus recombination: physical mapping of crossover events.
Cell 4, 113-119

- Wolf, H., zur Hausen, H., and Becker, V. 1973.
EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells.
Nature 244, 245-247
- Wolf, H., zur Hausen, H. and Werner, J. 1975.
EBV DNA in non-lymphoid cells of nasopharyngeal carcinomas and in
a malignant lymphoma obtained after inoculation of EBV into
cottontop marmosets.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39
- Wolfe, L.G., Falk, L.A., and Deinhardt, F. 1971.
Oncogenicity of Herpesvirus saimiri in marmoset monkeys.
J. Natl. Cancer Inst. 47, 1145
- Wright, J., Falk, L.A., Wolfe, L.G., and Deinhardt, F. 1980.
Herpesvirus saimiri: Protective effect of attenuated strain
against lymphoma induction.
Int. J. Cancer 26, 477
- Zur Hausen, H. 1980.
Oncogenic Herpesviruses.
in DNA Tumor Viruses. Molecular Biology of Tumor Viruses,
Second Edition, Part 2 747-795
- Zur Hausen, H., and Schulte-Holthausen, H. 1972.
Detection of EB viral genomes in human tumor cells by nucleic
acid hybridization.
in Oncogenesis and Herpesviruses
Biggs, P.M., de Thé, G., and Payne, L.N., eds.
IARC Press, Lyon.
- Zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W.,
Henle, G., Clifford, P., and Santesson, L. 1970.
EBV-DNA in biopsies of Burkitt tumour and anaplastic carcinomas
of the nasopharynx.
Nature 228, 1056-1058

G. Lebenslauf

12.11.1953	Als Sohn von Karl Keil und seiner Ehefrau Hildegard, geb. Pursche, in Großenhain/Sachsen geboren.
1960-1964	Besuch der Grundschule in Singen/Htwtl
1964-1973	Besuch des Gymnasiums in Singen
Mai 1973	Abitur
1973-1978	Studium der Biologie an der Universität Konstanz
Juni 1978	Diplomprüfung Diplomarbeit: Untersuchungen zur Neusynthese und Phosphorylierung von Histon H1 in mit Con-A stimulierten Rinderlymphozyten.
1978-1981	Wiss. Angestellter am Inst. f. klin. Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg
ab Juni 1981	Wiss. Angestellter an der Bundesforschungsanstalt für Viruskkrankheiten der Tiere in Tübingen

Günther Keil

Copy - Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131 - 26197